

CONTRIBUTION
A L'ÉTUDE
de la purification de la Pepsine
PAR APPLICATION
de ses propriétés physico-chimiques

THÈSE
pour l'obtention du Diplôme de Docteur de l'Université de Paris
(PHARMACIE)
présentée et soutenue le 28 Février 1929

PAR
Jacques PLÉ
Pharmacien,
Ancien Interne des Hôpitaux de Paris, Licencié ès-sciences,
Ancien Élève de l'Institut Pasteur

JURY { MM. TASSILLY, *Président*
HÉRISSEY, *Professeur*
FABRE, *Agrégé*

PARIS
IMPRIMERIE VOUZELLAUD, DAIRE, & Cie
65, Rue de la Chapelle, 65

1929



Digitized by the Internet Archive
in 2026

CONTRIBUTION
A L'ÉTUDE
de la purification de la Pepsine
PAR APPLICATION
de ses propriétés physico-chimiques

THÈSE
pour l'obtention du Diplôme de Docteur de l'Université de Paris
(PHARMACIE)
présentée et soutenue le 28 Février 1929

PAR
Jacques PLÉ

Pharmacien,
Ancien Interne des Hôpitaux de Paris, Licencié ès-sciences,
Ancien Élève de l'Institut Pasteur

JURY { MM. TASSILLY, *Président*
HÉRISSEY, *Professeur*
FABRE, *Agrégé*

PARIS
IMPRIMERIE VOUZELLAUD, DAIRE, & C^{ie}
65, Rue de la Chapelle, 65

1929

Personnel de la Faculté de Pharmacie

ADMINISTRATION

MM. RADAIS, *Doyen*, O. *, ☉ I.
PERROT, *Assesseur*, O. *, ☉ I.
G. DURSENT, *Secrétaire*, *, ☉ I.

PROFESSEURS

MM. N..., Chimie minérale.
RADAIS, O. *, ☉ I. Cryptogamie et Microbiologie.
BEHAL, Membre de l'Institut, C. *, ☉ I. Chimie organique.
PERROT, O. *, ☉ I. Histoire naturelle des médicaments.
COUTIÈRE, O. *, ☉ I. Zoologie.
GRIMBERT, *, ☉ I. Chimie biologique.
LEBEAU, O. *, ☉ I. Pharmacie chimique.
DELÉPINE, O. *, ☉ I. Hydrologie et Hygiène.
GUERBET, *, ☉ I. Toxicologie.
BOUGAULT, *, ☉ I. Chimie analytique.
GORIS, *, ☉ I. Pharmacie galénique.
GUÉRIN, *, ☉ I. Botanique générale.
TASSILLY, *, ☉ I. Physique.

Professeurs honoraires : MM. MOUREU, G. O. *, ☉ I. et A. VILLIERS, *, ☉ I.

CHARGÉS DE COURS

MM. DAMIENS, *, ☉ I. Minéralogie.
MARC HONNORAT, *, ☉ I. Législation et Déontologie pharmaceutiques.
LUTZ, *, ☉ I. Cryptogamie.

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. SOMMELET, *, ☉ I.	MM. HÉRISSEY, *, ☉ I.	MM. MASCRÉ, ☉ I.
DAMIENS, *, ☉ I.	DELABY, *, ☉ A.	FLEURY, ☉ I.
LUTZ, *, ☉ I.	PICON, ☉ I.	BACH, ☉ I.
LAUNOY, O. *, ☉ I.	FABRE, ☉, A.	

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. DEFACQZ, *, ☉ I. Chimie générale.
SOMMELET, *, ☉ I., FABRE, ☉ A. : *Agrégés*,
chargés des travaux de Chimie analytique.

SOUÈGES, ☉ I. Micrographie.
LEROUX, ☉ I. Physique.
DEVAL, ☉ I. Microbiologie.
HÉRISSEY, *, ☉ I., DELABY, *, ☉ A., PICON, ☉ I.

Agrégés, chargés des Travaux généraux de 4^e année.

Bibliothécaire en Chef : M. BEAULIEUX, ☉ I.



A MONSIEUR LE PROFESSEUR TASSILLY,
PROFESSEUR DE PHYSIQUE A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS,
CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR,

*Qui m'a fait le grand honneur
d'accepter la présidence de cette thèse,
Très respectueux hommage.*

A MONSIEUR R. FABRE,
PROFESSEUR AGRÉGÉ A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS,
PHARMACIEN EN CHEF
DU GROUPE HOSPITALIER NECKER-ENFANTS MALADES.

Témoignage de ma respectueuse reconnaissance.

A MONSIEUR H. PÉNAU,

DOCTEUR ÈS-SCIENCES,

En témoignage de ma vive gratitude.

A MES PARENTS

A MA FEMME

A TOUS CEUX QUI ME SONT CHERS

INTRODUCTION

Depuis la découverte de la pepsine par Schwann, en 1836, découverte qui renversa définitivement l'ancienne hypothèse de l'action uniquement mécanique de l'estomac, sur les aliments ingérés, tout près d'un siècle s'est écoulé.

Durant cette longue période, de très nombreux travaux ont été publiés sur cette question, et un tel sujet d'étude pourrait paraître, à première vue, un peu désuet.

Mais les progrès importants accomplis pendant ces dernières années, en chimie biologique, et l'aide toute nouvelle que lui a apporté la physique, permettent de poursuivre plus avant des recherches déjà anciennes.

En particulier, aux notions d'acidité, de neutralité et d'alcalinité des solutions mesurées par des méthodes titrimétriques classiques, au moyen de la phtaléine du phénol ou du tournesol, a succédé la théorie et la mise en pratique de la notion des pH. On disait par exemple que l'acidité optima de la digestion stomacale est de 0 gr. 03 p. 100 en acide chlorhydrique chez l'homme ; maintenant, les mesures exactes de la dissociation ionique des milieux montre que l'acidité optima du suc gastrique correspond à une concentration en ions H^+ , située entre $1,7 \times 10^{-2}$ et 3×10^{-2} c'est-à-dire à des pH situés entre 1,77 et 2,66. Cette notation est donc plus précise et plus juste.

Sans entrer dans le détail de la théorie des pH, nous rappellerons cependant que c'est ARRHENIUS (1) qui le premier,

en 1887, émit l'hypothèse que les acides, les bases, les sels, en dissolution, c'est-à-dire des électrolytes, ont un certain nombre de leurs molécules scindées en deux constituants, possesseurs chacun de masses électriques égales, mais de signe contraire, qui sont les *ions*. Lorsqu'on fait passer un courant électrique dans une telle solution, les ions acides (ions+), chargés positivement, se groupent autour de l'électrode négative, et les ions alcalins (ions—), chargés négativement, se groupent autour de l'électrode positive. Mais il reste toujours en solution des molécules non dissociées, composées de l'accolement d'ions positifs et d'ions négatifs. Tandis que les manuels classiques disaient qu'un acide est un corps qui possède dans sa molécule un ou plusieurs atomes d'hydrogène remplaçables par un métal, la définition d'un acide peut maintenant s'énoncer plus exactement ainsi : c'est un corps qui, mis en solution dans l'eau, est capable de libérer des ions positifs. Il faut donc considérer dans un acide, l'hydrogène total et l'hydrogène libéré sous forme d'ions actifs, par ce même acide en solution. L'hydrogène total est mesuré par les méthodes titrimétriques ordinaires, et, l'hydrogène libéré exprime l'acidité réelle du milieu.

L'alcalinité peut être définie de la même manière.

Une solution est neutre lorsque elle comporte un nombre égal d'ions positifs et d'ions négatifs, libres. C'est à peu près le cas de l'eau distillée pour laquelle on peut écrire : $H + OH = H^2O$, c'est-à-dire qu'elle a la même concentration en ions ($H+$) et en ions ($OH-$).

On a pu dénombrer ces ions libres et on a trouvé que le produit des ions H par les ions OH est un nombre constant et égal à $1/10^{14}$. On a prouvé que la dissociation des électrolytes en présence de l'eau est telle que le produit des ions H et des ions OH est toujours constant et égal à $1/10^{14}$. Pour cela leur nombre varie, et, si par addition d'acide, le nombre d'ions H augmente, le nombre d'ions OH diminue par combinaison avec un excès d'ions H pour reformer des molécules. Mais au delà d'une certaine limite, l'addition d'acide ou

d'alcali ne provoque plus de libération d'ions H ou OH, c'est la limite de dissociation. Donc, une solution renferme toujours à la fois des ions H et des ions OH ; au lieu d'exprimer leur nombre par $1/10$, $1/100$, $1/1000$, etc., ce qui forme une progression géométrique, on a recours à l'artifice mathématique qui consiste à écrire : $1/10$, $1/10^2$, $1/10^3$, etc.; or, 1, 2, 3, amorcent une progression arithmétique ; la relation entre les deux progressions étant la base de l'échelle logarithmique, on comprend que l'on se serve de cette notion logarithmique pour définir le pH.

Dans la pratique, il est plus facile d'évaluer le nombre d'ions H que le nombre d'ions OH, et c'est pourquoi on exprime toujours la dissociation ionique des milieux en mesurant leur acidité.

SOERENSEN (2), en 1909 a remarqué que dans toutes les valeurs de H il y a toujours la fraction $1/10$; l'exposant du dénominateur seul change ; il a proposé de ne conserver que l'exposant pour exprimer l'acidité des milieux, et de rappeler qu'il s'agit d'un exposant en écrivant la lettre p à côté de H, p voulant dire « puissance ».

La réaction d'un milieu est donc donnée par les valeurs du pH : « La valeur de PH est voisine de 0 pour une solution normale d'acide chlorydrique et voisine de 14 pour une solution normale de soude. La valeur PH d'une solution rigoureusement neutre, de l'eau pure par exemple, est voisine de 7,07; l'alcalinité ne peut dépasser 14,14 ». (R. DOURIS) (3). Il y a quelques années CLARK (4), a fait adopter pour des commodités typographiques, l'expression pH.

Avant de résumer les méthodes de mesure du pH, nous rappellerons sa définition : le pH est le logarithme de l'inverse de la concentration en ions hydrogène.

Pour mesurer le pH d'une solution il y a deux méthodes principales :

1^o *Méthode électrométrique.* — Cette méthode utilise la différence de potentiel qu'on peut observer entre les électrodes convenablement choisies, et les liquides en expé-

rience. Les appareils qui servent à ces mesures sont un peu différents selon leurs constructeurs et ont « des électrodes d'hydrogène ou à quinhydrone ou bien des électrodes d'oxygène ou d'air ou de verre » (BIGWOOD). (5) Le courant qui se forme étant mesuré, on peut connaître le nombre d'ions H dans la solution où ce nombre était inconnu.

2^o *Méthode colorimétrique.* — Un indicateur coloré, en présence d'un acide acquiert une couleur déterminée, et avec un alcali une couleur parfois très différente. Entre ces deux extrêmes il y a toute une gamme. Par la méthode électrométrique on peut mesurer pour chaque teinte intermédiaire le pH qui y correspond. Quand dans un mélange de pH inconnu on ajoute ce colorant, il se produit une coloration que l'on peut comparer à la gamme précédente, et obtenir ainsi le pH du mélange. Cette méthode est plus facile, mais moins précise que la précédente.

Nous avons voulu l'utiliser, et, à cet effet, avons préparé des échelles colorimétriques en suivant les données de MICHAELIS (6), mais les échelles, dont les pH varient de 0 à 4 et même 4,5 étaient très instables dans l'intensité et la valeur de leur coloration ; nous avons dû y renoncer, et utiliser la méthode électrométrique, à électrode saturée d'hydrogène.

Comme la pepsine est un colloïde, mais sans cependant entrer dans le détail de la théorie de cet état de la matière, nous rappellerons pourtant que « dans certaines conditions, les molécules chimiques peuvent se grouper entre elles et former des agrégats irréguliers, sans symétrie, de masses très variables que l'on a appelé des molécules physiques ou micelles » et que ; « lorsqu'on obtient un corps à l'état de micelles, on dit qu'il a pris l'état colloïdal » (THOMAS) (7) Les colloïdes ne sont pas visibles au microscope mais à l'ultramicroscope ; ils ne sont pas dialysables, c'est-à-dire qu'ils ne traversent pas les membranes de collodion ou de cellophane,

comme le font les électrolytes. La surface des grains colloïdaux est en raison inverse de la grosseur de ces grains, et plus ils sont fins plus leur surface totale est grande. Un courant électrique qui passe à travers une solution colloïdale fait déplacer les particules colloïdales dans le champ électrique, les unes vers la cathode, les autres vers l'anode ; ces particules sont donc chargées positivement (la silice, le bleu de méthylène, etc...) ou négativement (les métaux, l'amidon, l'éosine, etc.).

Les substances protéiques possèdent une charge négative en milieu faiblement alcalin, et une charge positive dans un milieu faiblement acide. La pepsine, comme la plupart des ferments solubles est à l'état colloïdal : « ce sont des ampholytes (c'est-à-dire qu'ils se comportent comme des électrolytes amphotères, lesquels ne sont ni positifs ni négatifs), se conduisant comme des acides en milieu alcalin, comme des bases en milieu acide et possèdent un point iso-électrique (THOMAS) (7).

Le point isoélectrique chez une substance protéique correspond au point de réaction neutre de celle-ci, qui possède alors une concentration en ions positifs égale à celle des ions négatifs. Au point isoélectrique, les électrolytes amphotères présentent des propriétés physiques minima, tout comme pour les colloïdes, qui, à ce point, ont une pression osmotique, une viscosité, un gonflement et une conductibilité minima. (J. LOEBE) (8).

Mais, si nous avons acquis la certitude de l'état colloïdal de la plupart des ferments solubles, notre ignorance reste grande, tant pour le ferment qui nous occupe, la pepsine, que pour les autres, en ce qui concerne leur composition exacte, puisqu'il n'a jamais été possible de les obtenir à l'état de pureté parfaite.

La complexité, dans la composition de ces sécrétions de la matière vivante, est en effet considérable, et lorsqu'à

partir des muqueuses stomacales lavées et râpées, on obtient un produit dont l'action protéolytique est mesurable, il est certain que dans ce produit se trouve de la pepsine, mais de la pepsine amalgamée plus ou moins intimement avec d'autres colloïdes, et des produits de digestion de la muqueuse elle-même : des albumoses et des poly-peptides.

Les procédés de préparation de la pepsine sont nombreux et ont perfectionné celui du Codex de 1866 qui la préparait de la manière suivante : Ouvrir la caillette, la vider des aliments qui s'y trouvent, laver cet organe et râcler la muqueuse interne ou la frotter rudement avec une brosse de chiendent ; il en résulte une pulpe dont la quantité est de 20 litres environ par 500 caillettes. Cette pulpe est délayée dans 20 litres environ d'eau filtrée où on la laisse macérer en agitant souvent pendant 2 heures ; le tout est jeté sur une toile grossière, le liquide est précipité par une solution de 750 grammes d'acétate de plomb cristallisé dans Q. S. d'eau. Le précipité est lavé à 3 reprises avec de l'eau, puis délayé dans de nouvelles eaux où l'on fait passer un courant d'acide sulfhydrique en excès : on filtre et on évapore à siccité à une température inférieure à 45°C. 10 litres de pulpe en donnent 125 grammes.

La pepsine obtenue par ce procédé est peu active ; nous rappelons, à ce propos, que le **TITRE D'UNE PEPSINE** selon la Pharmacopée française, est donné par le poids, exprimé en grammes, de fibrine de porc, essorée, hydrolysée par 1 gramme de pepsine ; c'est-à-dire qu'une pepsine de titre 100, digère 100 fois son poids de fibrine essorée, dans les conditions précises que nous exposons plus loin.

La Pharmacopée américaine dit que la pepsine « doit digérer au moins 3.000 fois son propre poids d'albumine d'œuf fraîchement coagulée et désagrégée ». Les auteurs américains écrivent de la façon suivante le titre de cette pepsine Standard : 1 : 3.000 U.S.P. Rappelons également que cette manière d'indiquer l'activité protéolytique d'une pepsine est telle, qu'elle donne très approximativement des nombres

dix fois plus grands que ceux par lesquels nous indiquons, en France, le pouvoir digestif de cette même pepsine.

C'est pour essayer de mieux isoler la pepsine des matières albuminoïdes qui l'accompagnent, que différentes méthodes physiques ont été appliquées, entre autres la dialyse et l'adsorption.

Nous ne les passerons pas toutes en revue, mais nous insisterons sur une publication récente de J. C. FORBES (1), (1927) qui indique plusieurs procédés d'extraction de pepsine purifiée. A la suite d'essais peu satisfaisants, il ne retient pas les adsorbants, tels que le charbon animal, le kaolin, le camphre, l'acide salicylique ou l'acétanilide. Il expose deux procédés d'adsorption de la pepsine, l'un à l'aide de l'hydroxyde d'alumine fraîchement préparé, et l'autre procédé tiré de celui de MARSTON (2) qui utilise la safranine.

La préparation de la pepsine par adsorption avec l'hydroxyde d'alumine est le suivant : le suc gastrique artificiel est préparé par digestion de la muqueuse stomacale de porc, hachée finement pendant plusieurs jours, dans une solution à 0,4 p. 100 d'acide chlorhydrique, puis cette liqueur jaunâtre est filtrée à travers une couche de pulpe de papier ; le filtrat est clair. A ce moment 20 grammes environ d'hydroxyde d'alumine, fraîchement préparé, sont additionnés à 4 litres du filtrat précédent. Après un contact de quelques heures, au cours desquelles il est bon d'agiter le mélange de temps à autre, le liquide surnageant est décanté, et l'hydroxyde d'alumine séparé par centrifugation. Le précipité est alors soumis à la dialyse contre une solution à 0,5 p. 100 d'acide chlorhydrique pendant quelques jours. De cette manière, l'hydroxyde d'alumine est dissous et éliminé. Un assez gros résidu de matière organique reste dans le sac à dialyse ; puis la dialyse est continuée contre de l'eau ordinaire. Le précipité est alors séparé par centrifugation : ce précipité montre un pouvoir digestif très faible, la dialyse est reprise pour le liquide restant, jusqu'à ce qu'un assez gros

précipité soit formé. Cette dernière précipitation est la meilleure lorsque le pH du milieu atteint 3,5 environ. Ce second précipité a une activité protéolytique de 1 : 42.000 U. S. P., c'est-à-dire titre 4.200 du Codex français. Cette pepsine est purifiée ensuite par une nouvelle dialyse, puis précipitation du ferment par une petite quantité d'acétate de plomb, en solution ; le précipité obtenu est débarrassé du plomb par l'addition d'une solution saturée d'acide oxalique. Après filtration et de nombreuses dialyses le petit précipité final est évaporé à température du laboratoire, puis séché dans un dessiccateur à acide sulfurique. Cette pepsine a une activité de 1 : 45.000 U. S. P., soit 4.500 en titre Codex.

L'autre procédé de préparation de la pepsine décrit par J. C. FORBES utilise l'adsorption par la safranine.

Vingt grammes de pepsine commerciale sont dissous dans environ 350 cc. d'eau distillée dans lesquels 50 cc. d'une solution à 1 p. 100 de safranine sont ajoutés. Le précipité formé du complexe pepsine-safranine est séparé par centrifugation et lavé avec de l'eau et recueilli après centrifugation ; après plusieurs traitements semblables le précipité est séché. Son activité protéolytique est de 1 : 46.000 U. S. P. ou 4.600 en titre Codex français. Cette pepsine se dissout en très faible quantité dans de l'eau additionnée de 0,2 p. 100 d'acide chlorhydrique. Pour la dissoudre il faut employer une solution très faible d'acide oxalique en solution alcoolique à 20 p. 100.

Pour séparer complètement la safranine de son complexe avec la pepsine, on soumet ce dernier, plusieurs fois à l'action de l'alcool isoamylique contenant environ 10 p. 100 d'éther.

Après extraction complète de la matière colorante, l'alcool isoamylique qui s'est dissout dans la solution pepsique est récupéré par des agitations répétées avec de l'éther renfermant environ 10 p. 100 d'alcool éthylique.

La pepsine est alors précipitée de sa solution par addition de deux fois son volume d'un mélange à parties égales d'alcool éthylique et d'éther.

Le pH optimum pour la précipitation apparaît au voisinage de 2,5 et correspond au point isoélectrique de la pepsine.

Le produit final ainsi obtenu a une activité protéolytique de 1 : 64.000 ou 6.400 du Codex français, ce rendement pondéral est de 3 grammes p. 100.

Cette méthode est donc meilleure encore que la précédente.

Peu de temps après ces publications de J. C. FORBES FREDERIC FENGER et ROBERT H. ANDREW (3) ont publié en juin 1927, une méthode d'extraction de la pepsine par l'acétone.

Les muqueuses stomacales du porc, prélevées aussitôt après la mort de l'animal sont lavées, disséquées et brossées dans de l'eau glacée, puis hachées. A chaque kilog de muqueuse hachée sont ajoutés 400 grammes d'eau distillée, acidulée avec 2 p. 100 d'acide chlorhydrique. Ce mélange est laissé au repos durant une nuit. Puis de l'acétone est ajouté au mélange afin qu'il en contienne un volume égal à son contenu total en eau. Ce mélange solvant extrait la pepsine, mais laisse la mucine et les tissus qui ne sont pas dissous. Le liquide est filtré, le filtrat a un pH compris entre 3,4 et 3,6 ; c'est un point important, si, en effet, un excès d'acide est employé pour l'extraction, la pepsine recueillie est moins abondante. Ce liquide est alors additionné d'une quantité d'acétone, telle, qu'on ait un pourcentage acétonique à 75 p. 100 dans le mélange. La précipitation est rapide et le liquide surnageant le précipité est décanté. Le précipité est centrifugé puis séché sous vide à basse température.

Cette pepsine est alors dissoute dans de l'eau acidulée de manière à avoir un pH de 1,8 à 2. Le liquide après filtration est dialysé rapidement contre de l'eau courante froide. Une première fraction formée à un pH de 2,4 à 2,5 puis une deuxième fraction formée à un pH de 2,5 à 3,0 enfin une troisième formée à un pH de 3,0 à 3,85 sont séparées de leur solution par centrifugation à grande vitesse, lavées avec 20 fois leur volume d'eau distillée et desséchées dans le vide à la température de la pièce.

L'activité protéolytique de la première fraction, c'est-à-dire celle formée à un pH de 2,5 environ, donc au point isoélectrique de la pepsine, est de 1 : 52.000 U. S. P. en moyenne ; un des échantillons de cette fraction, a montré une activité de 1 : 70.000 U. S. P.

L'activité des portions suivantes est de 1 : 45.000 en moyenne. L'auteur ajoute que les résultats varient avec les animaux et la saison pendant laquelle ils ont été abattus.

Nous nous sommes inspiré des publications américaines, ainsi que des données de chimie physique, que nous avons déjà exposées, pour procéder à l'étude systématique de l'action floculante de l'acétone, puis de l'alcool, sur la pepsine en fonction du pH.

Nous avons fait varier d'abord le pH du milieu, puis, au pH optimum de non destruction de la pepsine, nous avons fait varier le pourcentage du liquide floculant afin d'obtenir par ce procédé rapide, une purification intéressante de la pepsine.

A défaut de ce résultat, nous nous proposons de déterminer les causes qui modifient le rendement en activité protéolytique, ainsi que le rendement pondéral des précipités obtenus.

Nous avons divisé notre travail en quatre chapitres :

CHAPITRE I. — *Mesure de l'activité pepsique.*

A. Méthodes de dosage de la pepsine à l'aide de l'édestine.

B. Modification de la Méthode de Fuld.

CHAPITRE II. — *Action de l'acétone sur la pepsine.*

A. Etude du pourcentage acétonique nécessaire à la floculation d'une solution de pepsine.

- B. Etude de l'activité fermentaire de la pepsine en présence de l'acétone.
- C. Pepsine obtenue par précipitation au moyen d'acétone à différents pourcentages.
- D. Pepsine obtenue par précipitations acétoniques fractionnées.

CHAPITRE III. — *Action de l'alcool sur la pepsine.*

- A. Etude de l'activité fermentaire de la pepsine en présence de l'alcool.
- B. Pepsine obtenue par précipitation au moyen de l'alcool absolu à différents pourcentages.
- C. Pepsine obtenue par précipitations alcooliques fractionnées.

CHAPITRE IV. — *Applications de ces résultats à l'étude d'un élixir de pepsine.*

Conclusions générales.

Nous ressentons très vivement l'honneur que nous font M. le Professeur TASSILLY, en acceptant la présidence de cette thèse, et M. le Professeur agrégé HÉRISSEY, qui a bien voulu faire partie du Jury. Nous leur adressons nos respectueux remerciements pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail.

Nous avons également à cœur de remercier M. le Professeur agrégé R. FABRE, Pharmacien en Chef du groupe hospitalier Necker-Enfants-Malades, qui nous a indiqué ce sujet de recherches, et nous a donné toutes facilités de le mener à bien.

Nous prions M. PÉNAU, Docteur ès-Sciences, qui assume la direction technique des Etablissements Byla, de croire à notre vive reconnaissance. M. PÉNAU nous accueille avec une grande amabilité dans son laboratoire d'études, et voulut

bien mettre à notre disposition son matériel puissant et modèle ; au cours de nos travaux, il sut trouver le temps nécessaire pour nous donner de judicieux conseils ; son goût pour la recherche scientifique et son ardeur au travail, furent pour nous de précieux encouragements.

Nos remerciements iront également aux collaborateurs de M. PÉNAU, entre autres à Mlle HARDY, notre confrère et ancienne collègue durant notre internat.

CHAPITRE I

Mesure de l'activité pepsique

Comme il nous fallait envisager la possibilité d'effectuer plusieurs essais de pepsine dans le moins de temps possible, nous avons dû employer une autre méthode que celle du Codex, laquelle exige 6 heures de contact entre la pepsine et la fibrine au bain-marie à 50°. Nous avons cependant eu recours à elle, en raison de sa grande exactitude, pour comparer avec ce procédé la méthode que nous avons utilisée. Le Codex dit :

“ La pepsine doit répondre à l'essai suivant :

Pepsine	0,10 gr.
Eau distillée ...	58,50 —
Acide chlorhydrique dilué..	1,50 —
Fibrine <i>desséchée</i> (R)	2,50 —

Dans un flacon à large ouverture, introduisez la fibrine, l'eau distillée et l'acide chlorhydrique dilué ; placez ensuite ce flacon dans une étuve ou un bain-marie chauffé à +50°, jusqu'à ce que le mélange ait atteint la même température, ajoutez alors la pepsine et faites digérer pendant six heures en ayant soin, au début, d'agiter fréquemment jusqu'à dissolution complète de la fibrine, et ensuite toutes les heures environ.

Laissez refroidir et filtrez.

10 centimètres cubes de la liqueur ainsi obtenue ne doivent pas, à la température ordinaire, se troubler par l'addi-

tion de 20 gouttes d'acide azotique officinal. Dans cet essai on peut remplacer la fibrine desséchée par 10 grammes de fibrine essorée (R) ; il faut alors réduire à 51 grammes la proportion d'eau distillée.

Le Supplément du Codex indique de procéder à l'addition de l'acide azotique à la température de 17° à 19° au lieu de la température ordinaire.

Avant de fixer notre choix sur l'une des méthodes différentes de la méthode officielle, nous avons étudié le principe de quelques-unes d'entre elles :

1° *Méthode des tubes de Mell.* — Nous avons rejeté cette méthode puisqu'elle demande 10 heures de contact entre les tubes d'albumine coagulée et la solution de pepsine.

2° *Méthode de Jacoby.* — Elle repose sur le fait qu'une matière protéique, la ricine, en solution diluée dans NaCl, fournit un liquide trouble qui, après un contact au bain-marie, de 3 heures, devient transparent. Ce temps trop long nous a fait également rejeter cette méthode.

3° *Méthode viscosimétrique.* — Elle a pour principe qu'une solution protéique déterminée a une viscosité mesurable ; après action liquéfiante de la pepsine cette viscosité diminue et cette diminution sert à exprimer l'activité fermentaire. Cette méthode exige une à deux heures de manipulations aussi nous ne l'avons pas retenue, pas plus que les méthodes réfractométrique et polarimétrique.

A. MÉTHODES DE DOSAGE DE LA PEPSINE

. A L'AIDE DE L'ÉDESTINE

Par contre, les méthodes d'essai de la pepsine, qui utilisent l'édestine comme matière albuminoïde à digérer, ont fixé notre attention en raison de leur rapidité.

C'est en prévision de leur étude systématique, que nous avons préparé de l'édestine.

L'édestine est une matière protéique végétale, une globuline qui se trouve à côté de matières grasses abondantes, dans les graines de chènevis, le chanvre textile « *Cannabis saliva* » à raison de 10 p. 100 environ.

Elle fut extraite pour la première fois de ces semences par RITTHAUSEN (12) en 1881.

Préparation. — Nous l'avons préparée, en nous inspirant de quelques-uns des travaux déjà parus à ce sujet, [G. BERTRAND (13), RENAUD (14), FROSSARD (15)] de la manière suivante :

Une quantité déterminée de semences de chanvre est broyée aussi finement que possible au moulin. La poudre obtenue, qui contient environ 30 p. 100 de matières grasses, est épuisée dans une allonge avec de l'éther en quantité suffisante pour que le liquide qui s'écoule soit clair. Cette poudre est alors séchée dans le vide.

Son poids étant noté, la poudre de semence dégraissée est remise à macérer pendant une heure au bain-marie, avec une solution de chlorure de sodium à 10 p. 100 en agitant très souvent.

La macération est filtrée sur entonnoir à filtration chaude à la température de 60° et le filtrat est recueilli.

Le magma qui reste sur le filtre est mis à nouveau à macérer pendant une heure au bain-marie à 60° dans une solution de NaCl à 10 p. 100. On filtre à chaud à 60° comme précédemment.

Les deux filtrats sont réunis ; leur mélange est alors dialysé dans un sac en cellophane, contre de l'eau courante ordinaire d'abord, puis contre de l'eau distillée, ensuite ; on voit bientôt apparaître dans le sac à dialyse une poudre grisâtre qui se rassemble dans le fond du sac ; c'est l'édestine.

Purification. — Le contenu du sac est repris par trois

fois son poids de solution de chlorure de sodium à 10 p. 100, pendant une heure. Le mélange est filtré à chaud à 60°, le liquide de filtration est dialysé comme précédemment.

Le liquide resté dans le sac à dialyse est recueilli, décanté, la partie surnageante est siphonnée. Le précipité obtenu est lavé sur un Büchner avec de l'alcool à 95° puis avec de l'éther anhydre pour le déshydrater.

Le magma est écrasé sur un large plateau et mis à sécher dans le vide à la température de 50°.

Propriétés. — L'édestine ainsi obtenue se présente sous l'aspect d'une poudre couleur crème, offrant au microscope une forme cristalline très nette, octaédrique.

L'édestine est complètement insoluble dans l'eau. Elle est soluble dans les solutions salines telles que les solutions de chlorure, bromure, ou iodure de sodium, potassium, magnésium, calcium, strontium ou baryum (OSBORNE) (16). Les solutions de sulfates sont de mauvais solvants de l'édestine et c'est le plus généralement une solution de chlorure de sodium à 10 p. 100 qui est employée pour la dissoudre, quand on veut la retirer des graines de chènevis.

L'addition d'eau distillée à ces solutions salines a pour effet d'insolubiliser l'édestine, qui précipite. L'édestine se dissout également dans les solutions d'acide chlorhydrique faibles, et elle en est précipitée par addition d'une solution de chlorure de sodium à saturation : réciproquement sa solution chlorurée est précipitée par addition d'acide chlorhydrique.

Une solution chlorhydrique d'édestine est précipitée par l'addition d'acide azotique.

Les principales méthodes de dosage de la pepsine, à l'aide de l'édestine, sont les suivantes :

1° Méthode de Delaunay et Bailly.

C'est de cette dernière propriété que se sont servis DELAUNAY et BAILLY (17), en 1915, pour proposer une méthode de dosage de l'activité pepsique :

« On fait la solution suivante :

Edestine	0,gr.50
Eau chlorhydrique à 2,5 0/00 HCl..	100 cc.

« On filtre, on met 20 cc. de cette solution dans un tube à essai. On plonge dans un bain-marie à 50° et, lorsque l'équilibre de température est établi, soit au bout de 10 minutes environ, on ajoute 0 gr. 02 de pepsine ; c'est-à-dire 4 cc. d'une solution de 0,50 de pepsine dans 100 cc. d'eau chlorhydrique à 2,5 p. 1000. On laisse à cette température pendant 15 minutes. On sort le tube de l'étuve, on le plonge rapidement dans un grand bain d'eau à 17°, et en même temps on ajoute XXX gouttes d'acide azotique officinal. »

« L'expérience montre que si la pepsine titre suffisamment c'est-à-dire si elle répond bien à l'essai actuel du Codex, fait avec une fibrine fraîche ou séchée récemment et soigneusement, il ne doit se produire dans le tube aucun précipité : l'équilibre de température entre le tube et le bain d'eau étant établi à 17° il ne doit pas même se faire un véritable louche, mais seulement une légère opalescence égale tout au plus à celle que donne une goutte de lait dans le même volume d'eau (20°) observé dans un tube de même diamètre. Delaunay et Bailly citent les résultats des dosages effectués sur des échantillons de pepsine dont les activités relatives étaient 100, 90, 80, 60, 40 ; il a été trouvé :

Avec la première : réaction limite.

Avec la deuxième : opalescence nette, égale à environ celle de 2 gouttes de lait dans 20 cc. d'eau.

Avec la troisième : louche net.

Avec la quatrième : précipité.

Avec la cinquième : précipité abondant.

« D'autre part, en faisant varier le temps de contact entre

la pepsine et l'édestine, on arrive pour des titres de pepsine inférieurs au titre de 100 à obtenir la réaction limite, ainsi, tandis que :

La pepsine 100 donne la réaction limite en 15 minutes.
La pepsine 80 donne la réaction limite en 21 minutes.
La pepsine 60 donne la réaction limite en 27 minutes.
La pepsine 50 donne la réaction limite en 30 minutes.

Delaunay et Bailly ajoutent que les avantages de cette technique sont :

« 1^o L'utilisation d'une protéine plus constante dans son état physique.

2^o La rapidité de son application, 30 minutes environ suffisant à la totalité de l'essai.

3^o La concordance des résultats que pourront trouver des expérimentateurs différents.

4^o La précision des détails opératoires faisant place à l'imprécision des termes du Codex. »

Cette méthode emploie toujours le même poids de pepsine : 0 gr. 02, et le même temps de contact : 15 minutes ; ou bien mesure le temps nécessaire pour obtenir la fin de la digestion selon le pouvoir protéolytique des échantillons de pepsine étudiés.

Ces différents essais ont, de plus, été effectués par DELAUNAY et BAILLY, avec des pepsines de T. 100 ou inférieures à ce titre.

Nous avons cherché à appliquer leur méthode au dosage des pepsines dont les titres sont supérieurs à 100 et avons pensé que la manière la plus précise était de faire varier le poids de pepsine à l'exclusion des autres conditions d'expériences.

Sachant que 0 gr. 02 de pepsine T. 100 digèrent en 15 minutes, 0 gr. 125 d'édestine nous avons pensé qu'il faudrait

10 fois moins de pepsine T. 1000 pour obtenir le même résultat. Nous avons alors calculé les poids en pepsine qui seraient nécessaires et suffisants pour digérer en 15 minutes 0 gr. 125 d'édestine en supposant que leurs titres varient de 100 à 1.000 de 10 en 10 pour les titres faibles, puis de 25 en 25 et de 50 en 50 pour les hauts titres.

Avec des poids différents d'un échantillon de pepsine dont le titre 100 avait été rigoureusement contrôlé par la méthode du Codex à la fibrine, nous avons essayé en 5 tubes différents de provoquer la digestion plus ou moins avancée des 0 gr. 125 d'édestine. Dans le premier tube, nous avons mis 0 gr. 025 de cette pepsine, dans le second 0 gr. 022, dans le troisième 0 gr. 020 puis 0 gr. 0185 dans le quatrième, et enfin 0, gr. 0165 dans le cinquième. Nous pensions ainsi obtenir une gamme d'opacité allant en croissant fortement vers le cinquième tube. Or, après les 15 minutes de contact à 50°, puis refroidissement à 17° et addition de la quantité d'acide azotique indiquée, nous avons constaté des louches presque semblables dans chacun des cinq tubes. Si, comme nous l'espérions, nous avons pu distinguer une différence d'opalescence appréciable entre chaque tube, nous aurions pu dire que ces essais étaient assez sensibles, pour nous permettre d'établir une méthode de dosage de la pepsine.

Les poids de notre pepsine T. 100 mis en œuvre dans cette expérience, correspondaient selon notre hypothèse à des poids suffisants de pepsine de titre 80. 90, 100, 110 et 120 pour provoquer la digestion de l'édestine ; mais nous avons vu que ces poids variables de pepsine T. 100 provoquent une digestion très semblable dans les cinq tubes.

Nous avons recommencé de nombreuses expériences du même genre, à partir d'une pepsine de titre 450, puis avec une autre de T. 500 et enfin une autre de titre 1.000, à chaque essai, nous avons constaté que des différences notables dans les poids de pepsines à doser, n'entraînaient que des modifications de louche assez difficiles à apprécier avec exactitude.

Ainsi modifiée selon nos besoins, la méthode de DELAUNAY et BAILLY nous a paru d'une application délicate, aussi, nous a-t-il semblé intéressant de remonter à la technique originale de FULD.

2° Méthode de Fuld.

FULD et LEVISON (18) ont publié en effet en 1907 la technique suivante :

« 1° Prendre 90 cc. d'acide chlorhydrique N/10 et compléter à 300 cc. en ajoutant de la solution physiologique ou simplement de l'eau.

« 2° Dissoudre 0 gr. 20 d'édestine dans 200 cc. de solution (1) bien délayer dans un petit mortier et quand la solution est complète, filtrer pour avoir un liquide clair.

« 3° a) Dissoudre 0 gr. 50 de pepsine type dans 50 cc. d'eau physiologique. Quand tout est dissous, filtrer.

b) Cette solution type à 1 p. 100 est étendue successivement à 0 gr. 50 p. 100 en ajoutant un volume égal d'une solution renfermant 60 cc. N/10 p. 100 cc.

c) Puis 0 gr. 05 p. 100 avec la solution d'HCl (1).

« 4° Dissoudre 10 grammes de sel marin dans l'eau distillée et compléter à 100 cc. Filtrer.

« On prépare 10 tubes de 1 centimètre de diamètre renfermant chacun 2 cc. de solution (2) puis 0,9, 0,8 0,7... 0 cc. de solution (1) et 0,1, 0,2, 0,3... 1 cc. de solution fermentaire à 0,5 p. 100 ou à 0,05 p. 100.

« Après 30 minutes à la température *ordinaire* on ajoute dans chaque tube 1 cc. de solution (4) et l'on note le tube où la précipitation ne se produit plus.

« En prenant une solution de pepsine à 0,50 p. 100 il n'y a de précipitation dans aucun des tubes.

« En prenant une solution de pepsine à 0,05 p. 100 il y a :
Solution de pepsine : 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8.
(centimètres cubes) :

Précipitation : + + + + + + — —

« La précipitation cesse d'apparaître avec 0 cc. 7 de solution de pepsine à 0,05.

« 100 cc. de solution de pepsine à 0,05 p. 100 = 0, gr. 05 de pepsine type, par suite 0, cc. 7 de solution de pepsine à 0, gr. 05 p. 100 renferme 0, gr. 00035 de pepsine type.

« Donc, 0, gr. 00035 de pepsine = 2 cc. de solution (2) = 2 mmgr. d'édestine d'où un gramme de pepsine = 2/0,00035 = 5 gr. 714 d'édestine.

« La force de cette pepsine qu'on prendra pour type de comparaison est donc 5.714 unités ».

Différents essais effectués selon cette méthode nous donnèrent satisfaction; nous entreprîmes alors son adaptation à nos besoins.

B. - MODIFICATION DE LA MÉTHODE DE FULD

Il importait en effet pour nous, de pouvoir doser des pepsines de titres élevés aussi bien que des pepsines de titres moyens ou même très bas puisque nous nous proposons d'étudier la destruction plus ou moins grande de la pepsine au cours de sa purification, dans les conditions que nous exposerons plus loin.

A cet effet, nous avons utilisé deux pepsines BYLA dont les titres respectifs 100 et 1000 ont été contrôlés soigneusement par la méthode à la fibrine du Codex; nous avons procédé à l'essai de ces deux échantillons selon la méthode de FULD en employant pour une première série de 10 tubes

notre pepsine T. 100 en solution à 0,05 p. 100 et pour une autre série de 10 tubes notre pepsine T. 1000 en solution dix fois plus faible, c'est-à-dire à 0,05 p. 1000.

Pour la première ainsi que pour la deuxième série de ces essais de FULD, c'est aux tubes portant le numéro 8 que nous avons constaté la fin de l'opacité des milieux.

Par conséquent, d'une part l'addition de 0 cc. 80 d'une solution à 0,05 p. 100 de pepsine T. 100, soit 0 gr. 0004 de ce ferment, aux 2 mgr. d'édestine en solution, était nécessaire pour en obtenir la digestion complète. D'autre part avec 0 cc. 8 d'une solution à 0,05 0/00 de pepsine T. 1000, soit 0 gr. 00004, nous avons obtenu le même résultat.

Ces essais répétés plusieurs fois ont toujours montré une concordance satisfaisante.

Nous avons pu poser les relations suivantes :

Poids de pepsine $\times$ titre = constante = 0,04,

Puisque $0,0004 \times 100 = 0,04$,

Et que $0,00004 \times 1000 = 0,04$.

D'où $100 = 0,04 / 0,0004$, ou bien $1.000 = 0,04 / 0,00004$.

C'est-à-dire : titre = $0,04 / \text{poids de pepsine}$.

Ou bien : poids de pepsine = $0,04 / \text{titre}$.

Donc, connaissant le poids de pepsine mis en œuvre, il est possible de calculer le titre de cette pepsine ; et inversement, supposant connu le titre de la pepsine à étudier, on peut savoir quel en est le poids nécessaire pour obtenir la digestion de 2 mgr. d'édestine.

Il devient possible, par conséquent, de déterminer le titre d'une pepsine en prenant des poids variables et arbitraires de cette pepsine, et de conclure d'après le poids mis en œuvre le titre fermentaire correspondant.

Mais pour éviter les calculs à chaque essai nous avons établi le tableau suivant qui indique le poids de pepsine nécessaire pour obtenir la réaction limite de digestion, selon leurs titres correspondants.

Ces poids, pour alléger le tableau, ne sont pas inscrits, mais seulement les volumes de solution de la pepsine considérée qui y correspondent :

Concentration de la solution de pepsine.	Volume de la solution de pepsine à utiliser	Titre Codex correspondant
Solution à 0 gr. 05 pour 100 cc.	1.00	80
	0.88	90
	0.80	100
	0.72	110
	0.64	125
	0.52	150
	0.40	200
	0.34	225
Solution à 0 gr. 05 pour 200 cc.	0.32	250
	0.52	300
	0.44	350
	0.40	400
	0.36	450
Solution à 0 gr. 05 pour 500 cc.	0.32	500
	0.72	550
	0.66	600
	0.61	650
	0.57	700
Solution à 0 gr. 05 pour 1000 cc.	0.53	750
	1.00	800
	0.94	850
	0.88	900
	0.84	950
	0.80	1000
	0.76	1050
	0.72	1100

Concentration de la solution de pepsine.	Volume de la solution de pepsine à utiliser	Titre Codex correspondant
Solution à 0 gr. 05 pour 1000 cc.	0.68	1150
	0.66	1200
	0.64	1250
	0.60	1300
	0.58	1350
	0.56	1400
	0.54	1450
	0.52	1500
	0.49	1600
	0.46	1700
	0.44	1800
	0.42	1900
	0.40	2000
	0.38	2100
	0.36	2200
	0.34	2300
	0.33	2400
	0.32	2500
	0.30	2600
	0.29	2700
	0.28	2800
	0.26	3000

Dans ce tableau on peut voir qu'il n'y est pas fait mention des unités calculées selon FULD, en effectuant le quotient du poids d'édestine par le poids de pepsine qui la digère.

Cette sorte d'unité ne présentant pas pour nous d'intérêt, nous avons préféré conserver les titres du Codex français.

Au moment où FULD et LEVISON publièrent leur méthode la théorie des pH n'avait pas encore été mise au point et appliquée. Aussi nous avons pensé qu'il serait profitable d'étudier leur méthode à la lumière de cette théorie, afin de simplifier, si possible, le dosage.

À côté de la solution physiologique, c'est-à-dire d'une solution de chlorure de sodium pur à 9 grammes p. 1000 cc., dont le pH est voisin de la neutralité, FULD et LEVISON emploient une solution de : 300 cc. HClN/10 + eau physio-

logique Q.S. pour 1000 dont le pH = 1,56, puis une solution de : 600 cc. HCl N/10 + eau physiologique Q. S. pour 1000 dont le pH = 1.03.

Il nous a semblé préférable de préparer la solution suivante :

HCl N/10	400 cc.
Eau physiologique	Q. S. pour 1000 cc.

Le pH de cette solution est de 1,4 et correspond au pH d'activité optimum de la pepsine sur l'édestine WAKSAM et DAVISON (19).

Pour simplifier la méthode, nous faisons la solution de 0,20 d'édestine dans 200 cc. de cette solution à pH 1,4 ainsi que les autres solutions et dilutions nécessaires des échantillons de pepsine à étudier.

De cette manière, le mélange final qui est effectué dans les tubes est à un pH très voisin du pH 1,4. Comme les variations de température provoquent des différences notables dans l'action protéolytique de la pepsine, nous plongeons d'abord les tubes à essai dans un bain d'eau glacée ; nous avons ainsi la possibilité d'effectuer sans hâte l'addition des volumes exactement mesurés de la solution de pepsine aux 2 cc. de la solution d'édestine précédemment introduits dans les tubes. Les tubes que nous avons utilisés avaient un diamètre de 11 millimètres.

Nous portons ensuite l'ensemble des tubes dans un bain d'eau à 20°. Quand les 30 minutes nécessaires à l'essai sont écoulées, nous les refroidissons à nouveau dans le bain d'eau glacée pour arrêter l'action fermentaire, et ajoutons dans chacun d'eux 1 cc. d'une solution de chlorure de sodium à 10 p. 100. De cette manière la durée de la digestion est la même dans chaque tube puisque celle-ci débute et se termine au même instant.

Pour effectuer l'essai d'une pepsine par cette méthode, il est bon de prendre quelques précautions : lorsque les tubes

sont plongés dans l'eau à 20° il faut les agiter doucement pour éviter la mousse, les uns après les autres afin que le mélange soit bien réalisé ; puis les 30 minutes étant écoulées, il faut ajouter bien exactement 1 cc. de solution à 10 p. 100 de NaCl car le degré d'opacité des tubes varie non seulement avec le volume total, mais aussi avec la concentration différente en chlorure de sodium du mélange ; de plus, il est préférable que chacune des solutions employées soit filtrée.

Enfin, lorsqu'on veut obtenir un dosage aussi précis que possible, il est prudent d'effectuer parallèlement un dosage avec une pepsine standard dont le titre a été déterminé par la méthode du Codex.

La comparaison des tubes contenant le mélange à essayer et ceux contenant la pepsine standard, permet plus de justesse dans la lecture des résultats.

Le tube qui correspond à la réaction limite, doit être très transparent ou d'une opacité extrêmement faible, surtout appréciable en examinant le tube selon son axe.

Il est bien évident que les pesées de l'édestine et de la pepsine doivent être rigoureusement exactes.

Moyennant ces précautions et avec un peu de pratique, ce micro-dosage, dont toutes les opérations demandent une heure au maximum, offre une exactitude au moins aussi bonne que celle obtenue par la méthode du Codex.

Résumé de notre méthode de Fu'd modifiée.

Nous opérons de la manière suivante :

A) Préparer une solution de :

Solution 1 :

HClN /10 400 cc.

Eau physiologique à 9 p. 1000. Q. S. p. 1000 cc.

B) Dissoudre 0,20 centigrammes d'édestine pure, dans 200 cc. de la solution chlorhydrique (Solution 1) en commen-

çant par broyer la protéine dans un petit mortier avec un peu de solution 1. Filtrer.

C) Peser 0,50 centigrammes de pepsine à essayer ; dissoudre cette prise d'essai dans 100 cc. de solution 1. Filtrer.

D) Prélever 10 cent. cubes de cette solution à 0 gr. 50 p. 100 ; étendre ces 10 cc. à 100 avec la solution 1 pour avoir une solution à 0,05 p. 100.

E) Prélever ensuite 10 cc. de cette dernière solution à 0,05 p. 100 ; les étendre à 20 cc. avec la solution 1, pour avoir une solution à 0,05 p. 200.

F) Étendre 10 autres cc. de la solution de pepsine à 0,05 p. 100, à 50 cc. avec la solution 1, pour avoir une solution de pepsine à 0,05 p. 500.

G) Étendre enfin 10 cc. de la solution de pepsine à 0,05 p. 100 à 100 cc. avec la solution 1, pour avoir une solution de pepsine à 0,05 p. 1000.

H) Faire une solution à 10 grammes pour 100 de chlorure de sodium. Filtrer.

Telles sont les solutions nécessaires pour procéder au dosage de la manière suivante :

1^o Numéroté de 1 à 6, six tubes calibrés à 11 millimètres de diamètre, et les disposer dans un porte-tubes métallique.

2^o Verser dans chaque tube 2 cc. de la solution d'édessine, et plonger le porte-tube et ses 6 tubes dans un bain d'eau glacée.

3^o Chacun de ces 6 tubes correspondent à un titre d'activité pepsique qui sont fixés arbitrairement : par exemple, 100, 300, 600, 1.000, 1.500, 2.000, afin de procéder à un essai préliminaire ayant pour but de renseigner sur le titre approximatif de l'échantillon étudié.

4° Se reporter aux tableaux pages 23 et 24, et inscrire sur une feuille de papier les volumes des solutions de pepsine à concentration différentes, qui correspondent aux titres à déterminer ; c'est-à-dire pour l'exemple choisi :

0,80 cc. de solution de pepsine à 0,05 pour	100.
0,52 — — — —	200.
0,66 — — — —	500.
0,80 — — — —	1000.
0,52 — — — —	1000.
0,40 — — — —	1000.

5° Comme il est nécessaire que le volume soit constant dans les tubes, à 4 cc., il faut alors calculer par différence les volumes de solution 1 qui seront d'abord ajoutés aux 2 cc. de la solution d'édestine dans chaque tube. Pour l'exemple choisi ces volumes seront de 0,20, 0,48, 0,34, 0,20, 0,48, 0,60. Cette addition est faite à l'aide d'une microburette ou d'une pipette graduée au centième de centimètre cube, aux 2 cc. de la solution d'édestine déjà refroidis aux environs de 0°C.

6° Ajouter alors avec une autre microburette ou une autre pipette graduée au centième de centimètre cube, les volumes précédemment notés, des solutions de la pepsine à titrer.

7° Plonger les 6 tubes à la fois dans un bain à 20° C et les y laisser pendant 30 minutes exactement, en ayant soin de les agiter doucement, sans les retourner, de temps à autres.

8° Ce temps étant écoulé, replonger les 6 tubes dans l'eau glacée et agiter légèrement le porte-tubès pour hâter le refroidissement des mélanges pepsiques.

9° Ajouter dans chaque tube 1 cc. de solution de chlorure de sodium à 10 p. 100. Cette addition a pour but de précipiter l'édestine qui n'a pas été digérée.

10° Noter le tube dans lequel il n'y a pas de louche ; d'après le volume de solution de pepsine qui a été mis en œuvre, on a le titre correspondant. Pour une série d'essais

qui offrent une gamme d'opacité plus serrée, le terme de la réaction sera déterminé par l'examen axial des tubes : c'est dans celui qui ne présentera ainsi qu'un léger louche que sera considérée la digestion limite.

Un autre dosage est alors nécessaire pour fixer plus exactement le titre, qui par ces essais, n'a été que grossièrement mesuré. Dans la pratique, ces opérations préliminaires sont souvent inutiles, quand des présomptions peuvent avoir donné une idée du titre approximatif de la pepsine étudiée. La recherche du titre peut alors être faite d'emblée, dans des limites beaucoup plus rapprochées.

Nous donnons, comme exemple, un des tableaux que nous utilisons pour effectuer un dosage, selon la méthode que nous venons d'exposer :

N° des tubes.	1	2	3	4	5	6
Titres Codex correspondants	1000	1100	1200	1300	1400	1500
Solution d'édestine (en cc.)	2	2	2	2	2	2
Solution chlorhydrique (1) (en cc.)	0.20	0.28	0.34	0.39	0.43	0.47
Solution de pepsine à 0 gr. 05 pour 1000 (en cc.)	0.80	0.72	0.66	0.61	0.57	0.53
Après 30 minutes de contact : Solution NaCl 10 p. 100.	1	1	1	1	1	1

Ces études préliminaires nous ont donc amené à réaliser la mise au point d'une méthode rapide de dosage de la pepsine.

Un procédé de dosage comme celui du Codex qui exige au moins 6 heures aurait rendu notre travail extrêmement long, mais notre méthode, environ 5 fois plus rapidement exacte que celle du Codex, allait nous permettre un gain de temps appréciable. Elle nous a permis d'effectuer les très nombreux essais que nous nous proposons de faire sur la pepsine précipitée par des flocculants tels que l'acétone ou l'alcool, dans les conditions que nous exposons plus loin.

Il n'est pas douteux que cette micro-méthode, par sa précision et sa rapidité, pourrait rendre aux cliniciens quelque service.

CHAPITRE II

Action de l'acétone sur la pepsine

A. - ÉTUDE DU POURCENTAGE ACÉTONIQUE NÉCESSAIRE A LA FLOCCULATION D'UNE SOLUTION DE PEPSINE

Après avoir constaté que l'addition à une solution de pepsine d'un volume d'acétone tel que ce liquide entre pour 90 p. 100 dans le mélange, provoque instantanément la précipitation du ferment, nous avons étudié le pourcentage nécessaire d'acétone pour entraîner le début de louche, puis de floculation dans une solution de pepsine, lorsque l'acidité du milieu varie.

Nous avons utilisé une pepsine dont le titre 1000 a été rigoureusement contrôlé par la méthode du Codex.

Nous avons ensuite dissous dans une série de ballons jaugés de 25 cc., 2 gr. 50 de cette pepsine, avec une quantité suffisante de solutions à concentrations différentes, d'acide chlorhydrique ou de soude, pour avoir un volume de 25 cc. dont nous avons prélevé et introduit 5 cc. dans une série de tubes à essais calibrés de 15 millimètres. Nous avons donc avec cette série de tubes un volume constant de solutions à 10 p. 100 de pepsine T. 1000 ajustées à des pH différents.

Dans chaque tube nous avons ajouté, goutte à goutte, de l'acétone rectifié, au moyen d'une burette de Mohr, afin de connaître avec le minimum d'erreurs possibles le volume total contenu dans chaque tube au moment où nous constatons le début de louche, puis de floculation des mélanges différents.

Nous avons pu calculer ainsi quel était dans chaque tube le pourcentage acétonique nécessaire pour provoquer ces changements d'états de la pepsine.

Les résultats exposés dans le tableau ci-dessous permettent de tracer les deux courbes suivantes.

pH de la solution	Pourcentage d'acétone nécessaire pour provoquer le début de louche	Pourcentage d'acétone nécessaire pour provoquer le début de floculation
0.35	9	28
0.7	13	33
1.8	24	39
2.2	24	42
2.8	25	43
4.3	20	38
4.7	20	35
6.4	solution louche par elle-même	26
7.8	—	15
8.5	—	10
9.3	—	5

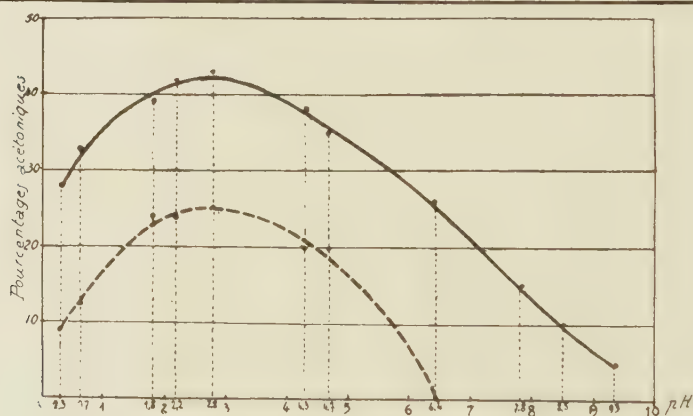


Fig. 1.

La courbe en pointillé indique le début de louche, la courbe en trait plein indique le début de floculation.

Nous avons considéré le début de louche comme tel, lorsque les lignes d'un papier quadrillé placé contre le tube étaient difficilement visibles ; nous avons admis qu'il y avait début de floculation lorsque de petites particules de pepsine pouvaient être vues glissant le long des parois du tube après son agitation ou son retournement.

Au cours de ces essais préliminaires, nous avons donc déterminé :

1° Le seuil de louchissement ;

2° Le seuil de floculation de la pepsine en solution, par l'acétone, en fonction du pH.

De l'examen des courbes, il ressort :

1° Qu'il y a un parallélisme entre les courbes de floculation et de louchissement du colloïde pepsique ;

2° Que c'est au voisinage des pH 2,2 à 2,8 que le volume d'acétone nécessaire est maximum, pour faire apparaître l'un et l'autre de ces phénomènes.

B. - ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ FERMENTAIRE DE LA PEPSINE EN PRÉSENCE DE L'ACÉTONE

Avec les expériences précédentes nous avons eu quelques renseignements primordiaux concernant la façon dont l'acétone agit sur la pepsine.

Nous avons alors pu étudier, ainsi que nous l'avons précédemment exposé (1) l'activité fermentaire de la pepsine précipitée de ses solutions, à l'aide d'un gros excès d'acétone pur, anhydre, et rectifié. Nous nous sommes placé au cours de ces essais dans des conditions bien déterminées d'acidité, de milieu, de temps et de température.

Nous nous sommes servi dans nos expériences d'une pepsine BYLA titre 1000 dont l'activité a été déterminé parallèlement par la méthode du Codex et celle de FULD modifiée.

La mesure des pH acides est rendue délicate et peu précise par la méthode des échelles colorimétriques, aussi, après divers essais infructueux avons nous dû y renoncer et employer uniquement la méthode électrométrique.

La température a été maintenue constante à 18°.

La solution à 10 p. 100 de notre pepsine dans l'eau distillée a un pH de 4,7.

Dans une première série d'expériences, la solution pepsique étant maintenue à son acidité normale (pH 4,7) nous

(1) Voir communication de H. PÉNAU et J. PLÉ, Etude sur la pepsine, *Journal de Pharmacie et de Chimie*, 16 juin 1928, 8^e série, tome VII, p. 601.

avons étudié l'action de l'acétone sur l'activité fermentaire de la pepsine en fonction du temps.

Dans une autre série d'essais nous avons étudié cette influence en faisant varier un seul facteur : le pH des solutions pepsiques, que nous avons successivement porté à 1,03, 2,5, 3,6, 4,7, 5,4, 6,0, 7,0.

Nous avons opéré de la manière suivante : une série de tubes à centrifuger numérotés, tarés, étant préparés dans un porte-tubes, on introduit dans chacun d'eux 2 cc. de solution de pepsine à 10 p. 100 ajustée au pH déterminé pour chaque expérience.

Dans chaque tube on ajoute 20 cc. d'acétone anhydre rectifié. On agite énergiquement et on abandonne le tube bouché pendant un temps déterminé.

On centrifuge alors à grande vitesse le liquide surnageant limpide.

Le précité étalé sur le paroi est desséché très rapidement sous vide profond (à 2 mm. de mercure) dans un exsiccateur à anhydride phosphorique.

Lorsque le précipité est sec, le tube et son contenu sont pesés ; par différence on a le poids du précipité.

Le précipité est alors titré au point de vue de son activité pepsique. A cet effet, il est dissous dans le tube lui-même dans 20 cc. de solution physiologique, à 9 grammes de chlorure de sodium par litre, une partie aliquote correspondant à 0,gr. 05 de précipité est utilisée pour l'essai qualitatif à l'édestine.

Pour faciliter l'examen des tableaux ci-dessous, nous avons exprimé le rendement pepsique du précipité en unités ; l'unité pepsique, étant le produit du poids exprimé en gramme, par le titre Codex. Dans ces conditions, le rendement de la pepsine mise en œuvre, avant précipitation correspond dans ces essais à $0,20 \text{ gr.} \times 1000 = 200$ unités pepsiques.

pH	Temps de contact	Poids du précipité	Titre	Rendement
1.03	Le précipité est incomplètement soluble, après un broyage prolongé au mortier, la poudre fine obtenue, essayée par la méthode du Codex ou par notre méthode à l'édestine, se montre complètement inactive.			
2.5	0	0.194	950	184
		0.1915	1000	191
		0.192	1000	192
	1 heure	0.195	1000	195
	2 heures	0.185	1050	194
	4 heures	0.188	1000	188
		0.182	1050	191
		0.190	950	180
	15 heures	0.185	1000	185
	24 heures	0.185	950	176
		0.181	1050	190
		0.180	1000	180
	48 heures	0.192	1000	192
		0.180	1000	180
3.6	0	0.189	1000	189
		0.187	950	177
		0.187	950	177
	1 heure	0.177	950	168
	4 heures	0.178	950	169
		0.181	950	172
		0.1795	1000	179
	15 heures	0.171	1000	171
	24 heures	0.177	900	159
		0.189	900	170
		0.177	850	150
	48 heures	0.189	850	160
		0.182	850	155

pH	Temps de contact	Poids du précipité	Titre	Rendement
4.7	0	{ 0.190	1000	190
		{ 0.190	900	171
		{ 0.199	950	189
	4 heures	{ 0.190	900	171
		{ 0.192	850	163
		{ 0.1845	900	166
	15 heures	{ 0.192	850	163
	24 heures	{ 0.190	850	161
		{ 0.188	900	169
		{ 0.1885	900	170
	48 heures	{ 0.182	850	154
		{ 0.185	850	157
5.4	0	{ 0.198	950	188
		{ 0.1955	900	175
		{ 0.196	900	176
	1 heure	{ 0.195	900	175
	4 heures	{ 0.180	850	153
		{ 0.181	850	153
		{ 0.1825	850	155
	15 heures	{ 0.190	800	152
	24 heures	{ 0.191	700	133
	48 heures	{ 0.181	500	90
		{ 0.189	500	103
6	0	{ 0.1865	600	111
		{ 0.194	550	106
		{ 0.192	650	124
	1 heure	{ 0.187	600	111
	4 heures	{ 0.188	450	84
		{ 0.187	500	94
		{ 0.192	450	86

pH	Temps de contact.	Poids du précipité	Titre	Rendement
6	15 heures	0.186	500	93
		0.190	500	93
	24 heures	0.186	500	93
		0.190	450	87
	48 heures	0.186	350	65
		0.189	400	75
7	0	0.188	100	18
	2 heures	0.187	100	18
	24 heures	0.188	90	17

De ces résultats, on peut tracer les 7 courbes suivantes :

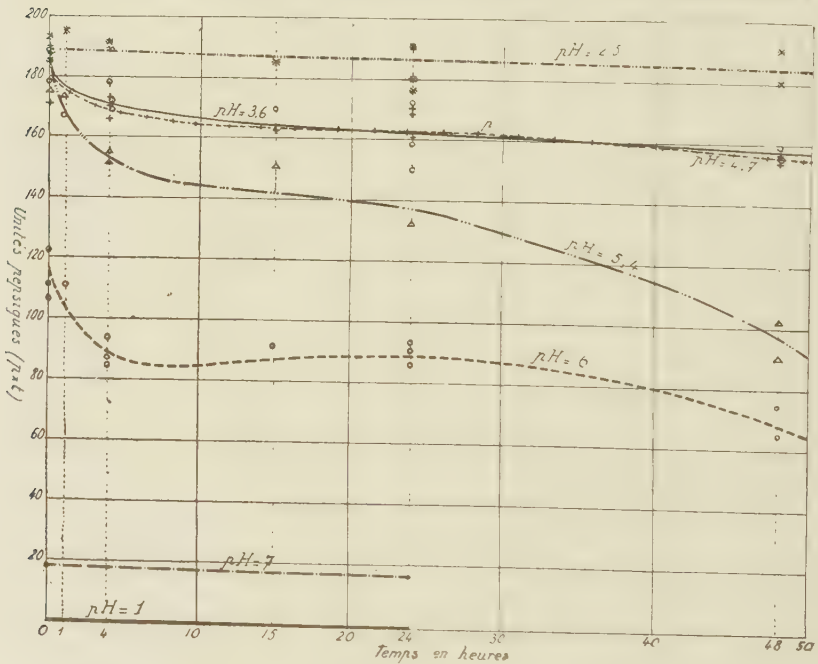


Fig. II.

Les différentes courbes représentent l'activité des précipités pepsiques correspondants, obtenus par précipitations acétoniques, en fonction du pH et du temps.

Et nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

1° Dans tous les cas, le poids du précipité obtenu est légèrement inférieur au poids de la pepsine mise en œuvre; fait qu'il faut attribuer à une dissolution légère de l'extrait pepsique ou d'un composant de cet extrait, dans la liqueur acétonique.

2° A pH 1,03 le précipité obtenu est insoluble et complètement inactif, comme si l'acétone en milieu très acide provoquait une véritable coagulation irréversible du colloïde pepsique.

3° A pH 2,5 point voisin du point isoélectrique de la pepsine, l'activité est entièrement conservée même au bout de 48 heures de contact acétonique.

4° Il en est de même aux pH 3,6, 4,7, 5,4, encore que pour ces derniers, il semble y avoir un amoindrissement de l'activité pepsique à partir de la 15^e heure; ce phénomène est surtout très sensible à pH 5,4.

5° A pH 6, l'activité est en moyenne diminuée de 50 p. 100 au bout d'une heure de contact acétonique, tandis qu'à pH 7, cette diminution, dans le même temps, atteint 90 p. 100.

C. — PEPSINE OBTENUE PAR PRÉCIPITATION AU MOYEN D'ACÉTONE À DIFFÉRENTS POURCENTAGES

Au lieu de mettre en présence d'une solution de pepsine un gros excès d'acétone, afin d'obtenir une précipitation aussi complète que possible de ce ferment, il nous a paru intéressant de savoir quels seraient les résultats de précipitation de la pepsine à des pourcentages acétoniques variables, mais bien déterminés.

Ainsi qu'il résulte du précédent exposé c'est au pH 2,5 point voisin du point isoélectrique de la pepsine, que celle-ci résiste le mieux à l'action destructive de l'acétone.

Nous avons donc opéré de la manière suivante :

Nous avons ajusté une solution de pepsine Byla T. 1000 à 10 p. 100 au pH 2,5 par addition d'une quantité voulue d'acide chlorhydrique normal ; nous avons préparé une série de 9 tubes à centrifuger séchés, tarés et numérotés, et avons versé dans chacun d'eux 5 cc. de cette solution de pepsine à pH 2,5 : chaque tube a donc reçu ainsi 0 gr. 50 de pepsine en solution.

Dans le premier tube nous avons versé 5 cc. d'acétone pur anhydre rectifié, pour obtenir un pourcentage acétonique de 50 p. 100 dans le mélange total des deux liquides. Le tube a été ensuite centrifugé à grande vitesse, et le liquide surnageant, décanté, le précipité rassemblé dans le fond du tube a seul été conservé.

Pour cela nous avons placé le tube et son contenu dans un exsiccateur à anhydride phosphorique et séché sous vide profond.

Dans le deuxième tube, nous avons versé une quantité calculée d'acétone, soit 6 cc. 1, pour que le pourcentage acétonique atteigne 55 p. 100 dans le mélange total. Puis nous avons procédé aux mêmes opérations que dans le premier tube : centrifugation et séchage.

Nous avons effectué les mêmes manipulations pour chacun des autres tubes en faisant croître le pourcentage acétonique de 5 en 5 p. 100 jusqu'à 90 p. 100 ; c'est ainsi que :

Pour obtenir un titre de :

60	p. 100	nous avons ajouté	7 cc. 5	d'acétone.
65	—	—	9 cc. 2	—
70	—	—	11 cc. 6	—
75	—	—	15 cc.	—
80	—	—	20 cc.	—
85	—	—	28 ^{cc.} 2	—
90	—	—	45 cc.	—

Pour opérer avec le moins de causes d'erreurs possibles nous avons versé l'acétone à l'aide d'une burette de Mohr, en ayant soin d'agiter convenablement le tube pendant cette addition afin d'assurer rapidement au mélange une homogénéité parfaite.

Nous avons maintenu la température constante, pendant la précipitation, à 18°.

Après avoir été séchés soigneusement, nous avons obtenu le poids des précipités par différence entre le poids du tube contenant le précipité desséché et le poids de ce tube.

Comme dans les expériences précédentes, nous avons dissous chaque précipité dans le tube lui-même avec 20 cc. de solution chlorhydrique de pH 1,4 (solution 1).

Une partie aliquote de la solution obtenue, correspondant à 0 gr. 05 de précipité, nous a servi au dosage de son activité pepsique, selon la méthode de Fuld modifiée.

1° *Résultats du rendement pondéral.* — Parmi les poids obtenus pour chaque titre acétonique nous avons retenu ceux-ci groupés dans le tableau suivant :

Pourcentages acétoniques	50	55	60	65	70
1 ^{er} essai	0.0355	0.059	0.0835	0.124	0.183
2 ^e essai	0.038	0.0565	0.102	0.1225	0.200
3 ^e essai	0.0455	0.0585	0.0875	0.116	0.207
4 ^e essai	0.043	0.0571	0.0915	0.123	0.1905

Pourcentages acétoniques	75	80	85	90
1 ^{er} essai	0.279	0.3515	0.396	0.440
2 ^e essai	0.2695	0.3445	0.408	0.4455
3 ^e essai	0.273	0.345	0.412	0.4355
4 ^e essai	0.2715	0.3425	0.4035	0.441

Ces résultats permettent de tracer une courbe dont l'ascension se montre le plus rapide entre les taux acétoniques de 65 p. 100 à 85 p. 100.



Fig. III

Représente les poids des précipités de pepsine obtenus à pH 2,5 par addition d'acétone, à des pourcentages différents, à partir d'un poids initial de pepsine de 0 gr. 50.

2° *Résultats du rendement en activité protéolytique des précipités.* — Pour les pourcentages acétoniques faibles de 50 p. 100 à 65 p. 100 les résultats du rendement fermentaire des précipités obtenus furent très discordants. Ces précipités n'avaient d'ailleurs pas la même apparence que les précipités obtenus à des taux acétoniques supérieurs à 70 p. 100 ; ils étaient blancs et granuleux, alors que les derniers étaient jaunes et pailletés.

Ces désaccords étaient dûs à la grande difficulté que ces précipités offraient à leur dissolution dans la liqueur acide en vue de leur titrage. A partir du taux acétonique de 70 p. 100 la solubilisation des précipités était de plus en plus aisée et à 90 p. 100 la solution obtenue était parfaite et très limpide. Aux taux acétonique de 60 p. 100 surtout, la solution était très imparfaite, et, malgré un broyage prolongé dans le tube même, ou dans un petit mortier d'agate avec du sucre, le titre Codex pour le taux 60 p. 100 se montrait inférieur à celui trouvé pour les pourcentages acétoniques précédents : 55 p. 100 et 50 p. 100. A ces taux en effet, la solution était meilleure, elle était presque complète à 50 p. 100 si bien que les résultats se présentaient de la façon suivante :

Pourcentages acétoniques	50	55	60	65	70
1 ^{er} essai	400	400	300	750	1800
2 ^e essai	450	300	250	500	1600
3 ^e essai	400	400	300	1200	1700
4 ^e essai	400	450	175	1000	1700
dosage par la méthode du Codex					

Pourcentages acétoniques	75	80	85	90
1 ^{er} essai	1700	1300	1000	1000
2 ^e essai	1800	1300	1050	1000
3 ^e essai	1600	1200	1000	1000
4 ^e essai	1700	1300	1000	1000
dosage par la méthode du Codex				

Les résultats ne devenaient concordants qu'à partir du taux acétonique de 70 p. 100 pour lequel l'activité protéolytique du précipité dépassait très notablement l'activité de la pepsine mise en œuvre, dont le titre était de 1.000.

Le pH des précipités difficilement solubles ou partiellement solubles, mesuré dans leurs propres solutions aqueuses était de 1,3 à 1,4. Pour remonter le pH du milieu et effectuer la solubilisation des précipités nous avons essayé l'addition d'ammoniaque dilué : 1 goutte d'ammoniaque au 1/40^e provoquait la dissolution parfaite, mais aussi l'inactivation totale du mélange.

Nous avons alors titré à l'aide de la méthode à la fibrine chacun des précipités après broyage prolongé au mortier avec du sucre. Les résultats ainsi obtenus ne firent que confirmer ceux que nous venons d'exposer : un point fut cependant précisé : le titre Codex du précipité recueilli après addition de 65 p. 100 d'acétone dans la solution de pepsine fut trouvé être exactement de 1.000 et non pas 500, 750 ou 1.200.

Les précipités obtenus à des pourcentages acétoniques faibles montraient une activité protéolytique extrêmement voisine de celle mesurée par notre méthode de Fuld modifiée. En particulier, le précipité obtenu avec 60 p. 100 d'acétone n'était pas mieux dosable avec exactitude par suite de sa dissolution très mauvaise dans la solution chlorhydrique.

Nous récapitulons tous ces résultats dans le tableau suivant, en groupant les deux tableaux précédemment établis et en y ajoutant pour chaque précipité, le calcul de son rendement fermentaire propre, exprimé en unités pepsiques, calculées en effectuant le produit de son poids par son titre Codex. Dans ces conditions, la pepsine dont nous nous sommes servi pour chaque essai, à raison de 0 gr. 50, avait un rendement théorique initial de : $0,50 \times 1000$ (titre) = 500 unités. Enfin deux courbes représentent ces diverses variations.

Pourcentages acétoniques	50 %			55 %		
	Poids	Titre Codex	Rendement	Poids	Titre Codex	Rendement
1 ^{er} essai	0.0355	400	14	0.059	400	23
2 ^e essai	0.038	450	17	0.0565	300	17
3 ^e essai	0.0455	400	18	0.0585	400	23
4 ^e essai	0.043	400	17	0.0571	450	24

Pourcentages acétoniques	60 %			65 %		
	Poids	Titre Codex	Rendement	Poids	Titre Codex	Rendement
1 ^{er} essai	0.0835	300	25	0.124	750	103
2 ^e essai	0.102	250	25	0.1225	500	61
3 ^e essai	0.0875	300	26	0.116	1200	139
4 ^e essai	0.1915	175	16	0.123	1000	123

Pourcentages acétoniques	70 %			75 %		
	Poids	Titre Codex	Rendement	Poids	Titre Codex	Rendement
1 ^{er} essai	0.183	1800	329	0.279	1700	473
2 ^e essai	0.200	1600	320	0.2695	1800	484
3 ^e essai	0.207	1700	351	0.273	1600	436
4 ^e essai	0.1905	1700	323	0.2715	1700	461

Pourcentage acétonique	80 %			85 %		
	Poids	Titre Codex	Rendement	Poids	Titre Codex	Rendement
1 ^{er} essai	0.3515	1300	456	0.396	1000	396
2 ^e essai	0.3445	1300	447	0.408	1050	428
3 ^e essai	0.345	1200	414	0.412	1000	412
4 ^e essai	0.3425	1300	445	0.4035	1000	403

Pourcentage acétonique		90 %		
		Poids	Titre Codex	Rendement
1 ^{er} essai		0.446	1000	446
2 ^e essai		0.4455	1000	444
3 ^e essai		0.4355	1000	435
4 ^e essai		0.441	1000	441

De l'examen général des courbes et tableaux ci-dessus il ressort :

1^o Que la courbe des poids des précipités obtenus montre un fléchissement notable entre les pourcentages acétoniques de 50 à 70 p. 100 ; elle montre aussi que les poids atteignent presque le poids mis en œuvre à 0.06 centigrammes près, au taux acétonique final de 90 p. 100.

2^o Qu'aux taux acétoniques de 60 et 65 p. 100, les rendements en unités pepsiques, tels que nous les avons définis, des précipités recueillis, ainsi que leurs titres Codex, sont aberrants : non seulement ces titres ne sont pas voisins les uns des autres, mais, pour le pourcentage acétonique de 60, les titres Codex se montrent inférieurs à ceux observés aux deux taux acétoniques précédents.

3^o Que le fléchissement de la courbe pour ce pourcentage de 60, provient sans doute d'un coefficient de partage de la pepsine entré le précipité et la liqueur surnageante, à ce point là, et ne peut s'expliquer que par la complexité extrême des précipités ainsi obtenus.

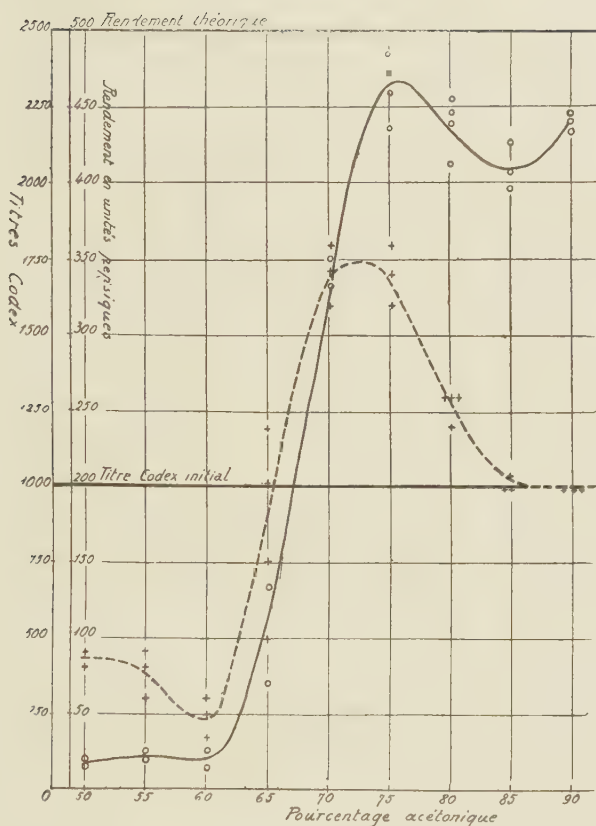


Fig. IV

La courbe tracée en pointillé représente les titres Codex et la courbe tracée en trait continu, les rendements.

4° Que les titres Codex des précipités qui se sont formés aux taux acétoniques de 70 et 75 p. 100, sont très voisins les uns des autres et atteignent 1.700 en moyenne ; ce qui représente un gain appréciable, puisque le titre Codex de la pepsine dont nous nous sommes servis était de 1.000.

5° Que le meilleur rendement observé est obtenu au taux acétonique de 75 p. 100, puisque dans ce cas il est en moyenne de 463, et s'approche donc beaucoup du rendement théorique, lequel est de 500.

D. - PEPSINE OBTENUE PAR PRÉCIPITATIONS FRACTIONNÉES ACÉTONIQUES.

En examinant la courbe des rendements en unités pepsiques des précipités obtenus à des pourcentages acétoniques différents, on peut voir que les précipités formés par addition 70 à 75 p. 100 d'acétone ont une puissance protéolytique supérieure à celle dont nous étions partis ; le titre Codex de ces précipités atteint 1.700 à 1.800, alors que le produit initial avait un titre de 1.000.

Nous pouvions donc légitimement penser qu'en procédant par fractionnements nous avions la possibilité d'atteindre une activité fermentaire meilleure ; c'est-à-dire qu'en éliminant, à des taux acétoniques faibles, des complexes colloïdaux peu actifs en pouvoir protéolytique, nous arriverions à isoler, dans la solution ainsi débarrassée d'impuretés, de la pepsine plus active.

Comme pour les expériences précédentes, nous avons utilisé de la pepsine de titre 1000, dont nous avons fait une solution à 10 p. 100, ajustée au pH, 2,5 avec de l'acide chlorhydrique normal.

Dans un premier tube à centrifuger, taré et numéroté, nous avons introduit 10 cc. de cette solution de pepsine qui contient donc 1 gramme de pepsine, puis 15 cc. d'acétone pur, rectifié, afin d'avoir un pourcentage acétonique de 60, dans le mélange.

Nous avons alors soumis le tube et son contenu à une rapide centrifugation ; après avoir décanté le liquide et l'avoir mis de côté, nous avons desséché le précipité sous vide profond. Dans le liquide décanté nous avons ajouté 8 cc. 2 d'acétone, pour que le mélange ainsi obtenu ait un pourcentage acétonique de 70 p. 100 ; après centrifugation, nous avons également décanté le liquide surnageant ; le préci-

pité étant mis à sécher, nous avons recommencé la même opération pour un taux acétonique de 80 p. 100 ; enfin nous avons évaporé à sec le liquide restant, dans une capsule tarée.

Tous ces mélanges ont été faits à la température de +18°.

Nous avons ensuite procédé à des essais semblables mais en effectuant des fractionnements à des pourcentages acétoniques différents. Nous avons titré chacun de ces précipités, au point de vue de son activité protéolytique, par notre méthode de Fuld modifiée.

En plus des poids et des titres Codex de chaque précipité, nous avons inscrit dans les tableaux suivants le rendement en unités pepsiques de chacun d'eux ; nous calculons ce rendement en effectuant le produit du poids du précipité de pepsine par son titre Codex.

Puisque nous avons utilisé, pour chaque essai, 1 gramme de pepsine T. 1000, nous avons donc un rendement théorique initial de 1000 ; à la fin de chaque série de fractionnements, en additionnant les rendements calculés pour chaque fraction de pepsine précipitée, nous devons retrouver tout près de 1000 ; or, ces totaux accusent une perte moyenne dans le rendement de 54 p. 100.

Nous avons groupé dans les 5 tableaux suivants, les résultats que nous avons obtenus.

Premier essai				Deuxième essai		
Pourcentages acétoniques	Poids	Titre Codex	Rendement	Poids	Titre Codex	Rendement
60 %	0.2075	350	72.6	0.1855	400	74.2
70 %	0.2500	1800	450	0.286	1600	457.6
80 %	0.292	50	14.6	0.2765	100	27.6
Extrait sec résiduel	0.279			0.2590		
Totaux	1.028		537.2	1.007		559.4

Pourcentages acétoniques	Troisième essai			Quatrième essai		
	Poids	Titre Codex	Rendement	Poids	Titre Codex	Rendement
60 %	0.191	300	57.3			
65 %	0.0875	250	21.8	0.257	800	205.6
70 %	0.221	1600	353.6	0.056	1000	56
75 %	0.1955	250	48.8	0.2555	1150	293.8
80 %	0.107	50	5.3	0.141	90	12.6
Extrait sec résiduel	0.2135			0.289		
Totaux	1.0155		486.8	0.9985		568.0

Pourcentages acétoniques	Cinquième essai		
	Poids	Titre Codex	Rendement
65 %	0.2785	1000	278
75 %	0.368	800	294
80 %	0.0825	0	0
Extrait sec résiduel	0.260		
Totaux....	0.9890		572

De tous ces résultats, il ressort que le total des rendements est toujours considérablement diminué et que les fractionnements les plus intéressants dans les titres Codex sont ceux qui sont obtenus avec les pourcentages de 60 à 70 puis 80 d'acétone.

Cette perte d'activité inexplicable était due, en partie, à la très mauvaise dissolution des précipités obtenus aux pourcentages acétoniques faibles ; cette dissolution très défectueuse empêchait leur dosage exact.

Nous nous sommes alors demandé s'il ne serait pas possible de diminuer cette insolubilisation partielle, et aussi, de diminuer la destruction fermentaire en opérant à basse température.

Pour cela, nous mettions dans le tube à centrifuger, d'abord l'acétone en quantité voulue, puis nous immergions jusqu'au goulot ce tube dans un mélange réfrigérant de glace et sel, qui avait une température de -18° . Nous ajoutions, ensuite seulement, la solution de pepsine, et la centrifugation était très rapidement menée pour éviter que la température ne remontât au dessus de 0. La dessiccation était opérée sous vide profond.

Par cette technique, les précipités, y compris celui obtenu à 60 p. 100 d'acétone, étaient très solubles dans la solution chlorhydrique (solution 1), leur dosage pouvait être, alors, aussi exact que possible.

Le tableau ci-après donne les résultats de ces essais effectués à la température de $+18^{\circ}$.

Pourcentages acétoniques	Premier essai			Deuxième essai.		
	Poids	Titre Codex	Rendement	Poids	Titre Codex	Rendement
60 %	0.107	650	69.5	0.121	650	78.6
70 %	0.3450	1800	621	0.320	1900	608
80 %	0.218	850	185.3	0.233	950	221
Extrait sec	0.343			0.345		
Totaux...	1.013		875.8	1.019		907.6

En résumé, pour les expériences de fractionnements effectués à la température de $+18^{\circ}$:

Le total des rendements est toujours considérablement diminué et les fractionnements les plus intéressants dans

les titres Codex sont ceux qui sont obtenus avec les pourcentages de 60 à 70, puis de 80 d'acétone.

Pour les expériences de fractionnements effectués à la température de -18° :

Le total des rendements est toujours meilleur que dans les cas précédents, et approche du rendement initial.

Il apparaît comme très probable que cette température, maintenue très basse, joue un rôle de protection de la pepsine vis à vis de l'acétone, puisque les titres Codex se montrent plus élevés.

CHAPITRE III

Action de l'alcool sur la pepsine

A. — ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ FERMENTAIRE DE LA PEPSINE EN PRÉSENCE D'ALCOOL

Bien que de nombreux travaux aient déjà été publiés sur cette question, il nous a paru intéressant d'étudier systématiquement l'action de l'alcool sur la pepsine en reprenant les mêmes conditions d'expériences que pour nos essais avec l'acétone.

Les auteurs comme VULPIAN (20) en 1873, à la suite d'essais de précipitation de la pepsine par l'alcool condamnent formellement les préparations de pepsine à base d'alcool, tandis que CHASSAING (21) en 1887, affirme que « l'alcool n'a pas dans la pratique pharmaceutique d'incompatibilité réelle avec la pepsine » et que BARDET (22) en 1887 énonce que « l'altération de la pepsine ne débute que dans un milieu de 25 p. 100 d'alcool ». Par la suite THIBAUT (23) en 1902, puis M. JAVILLIER (24) en 1909 concluent très nettement à l'altération de l'activité pepsique en présence d'alcool, surtout en fonction de l'élévation du titre alcoolique et du temps de contact, ainsi que de l'élévation du rapport alcool sur ferment.

Devant ces résultats discordants le but que nous nous proposons avait donc son importance.

Comme pour nos essais à l'acétone, nous avons utilisé

une pepsine BYLA dont le titre 1000 a été rigoureusement contrôlé par la méthode du Codex et par notre méthode de FULD modifiée. Ainsi que nous l'avions fait pour nos dosages de l'activité protéolytique des précipités obtenus par l'acétone, nous avons utilisé notre méthode de FULD modifiée, pour effectuer le dosage des activités fermentaires des précipités de pepsine, obtenus par l'alcool.

Nous avons préparé une solution à 10 p. 100 de notre pepsine T. 1000, dans l'eau distillée. Le pH d'une telle solution est de 4,7.

Dans une série de tubes à centrifuger numérotés et tarés, nous avons versé dans chacun d'eux 2 cc. de cette solution de pepsine; nous avons alors versé dans tous les tubes 20 cc. d'alcool absolu, la température étant maintenue à 18°. Un premier tube était immédiatement centrifugé, le liquide clair surnageant le précipité était séparé, et le précipité mis à sécher sous vide profond dans un exsiccateur à anhydride phosphorique. Chacun des autres tubes subissait les mêmes manipulations, après des temps de contact entre l'alcool et la pepsine, de 0 heure, 4 heures, 15 heures, 24 heures et 48 heures.

Les précipités une fois secs, les tubes étaient pesés, pour avoir ainsi le poids exact des précipités. Ensuite ils étaient dissous dans les tubes eux-mêmes, avec la solution chlorhydrique de pH 1,4; et une partie aliquote de la solution correspondant à 0 gr. 05 était utilisée pour le dosage de leur activité protéolytique.

Nous avons, comme pour nos expériences avec l'acétone porté les pH des solutions, successivement à : 1,03, 2,5, 3,6, 4,7, 5,4, 6 et 7.

Comme pour nos expériences semblables, faites avec l'acétone, nous exprimons pour chaque précipité, son ren-

dement en unités pepsiques en multipliant son poids par son titre.

Le rendement initial en unités pepsiques était de : 0 gr. 20 $\times 1000 = 200$.

Les tableaux suivants résument nos essais :

pH	Temps de contact en heures	Poids du précipité en grammes	Titre	Rendement.
1.03	0	0.1095	Les précipités étaient complètement insolubles et inactifs	
	24	0.1125		
2.5	0	0.1015	1200	122
		0.104	1200	125
		0.1125	1200	135
	4	0.107	1100	117
	15	0.112	1100	123
		0.1145	1200	137
	24	0.116	1100	127
		0.1205	1100	132
		0.1295	1050	136
	48	0.1125	1000	112
		0.1085	1000	108
		0.112	1050	117
3.6	0	0.1355	1200	162
		0.132	1100	145
		0.1305	1200	156
	4	0.133	1100	146
	15	0.137	1100	150
		0.144	1000	144

pH	Temps de contact en heures.	Poids du précipité en grammes	Titre	Rendement.
3.6	24	0.1395	1050	146
		0.1385	1050	145
		0.139	1000	139
	48	0.1365	1000	136
		0.139	1100	152
		0.137	1000	154
4.7	0	0.156	1100	171
		0.155	1100	170
		0.148	1100	164
	4	0.1535	1050	161
	15	0.1665	1000	166
		0.160	1000	160
	24	0.1565	1000	156
		0.157	1050	164
		0.157	1000	157
	48	0.157	1050	164
		0.150	1000	150
		0.1515	1050	159
5.4	0	0.181	950	171
		0.180	950	171
		0.1865	950	176

pH	Temps de contact en heures	Poids du précipité en grammes	Titre	Rendement.
5.4	4	{ 0.1800	900	162
		{ 0.181	900	163
	15	{ 0.186	850	158
		{ 0.1875	900	168
	24	{ 0.1795	900	170
		{ 0.1845	900	166
		{ 0.184	900	165
	48	{ 0.1800	850	153
		{ 0.1805	900	162
6	0	{ 0.1685	600	101
		{ 0.1735	650	112
		{ 0.172	650	111
	4	{ 0.1635	550	91
		{ 0.1675	600	100
	15	{ 0.165	600	99
		{ 0.172	600	103
	24	{ 0.168	600	100
		{ 0.168	550	92
	48	{ 0.1695	600	113
		{ 0.174	600	102
7	0	{ 0.169	250	42
	24	{ 0.162	250	40

Ces résultats nous ont permis de tracer les courbes suivantes :

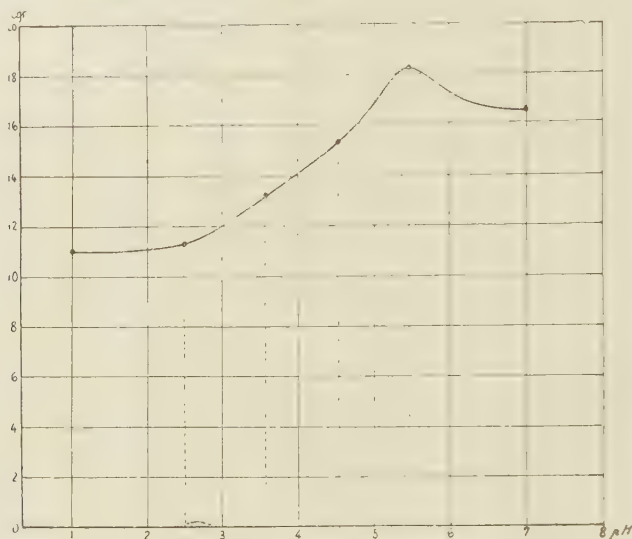


Fig. V.

La courbe représente les poids de précipités de pepsine obtenus par précipitation alcoolique, à différents pH avec un poids initial de 0 gr. 20.

La remarque peut être la plus importante à faire, c'est que la pepsine est mieux précipitée à des pH s'éloignant du pH 2,5 puisque à ce pH les poids moyens obtenus sont les plus faibles ; ces poids augmentent progressivement jusqu'au pH 5,4 pour redescendre nettement aux pH plus alcalins.

Les titres Codex trouvés sont, aux pH acides surtout au pH 2,5 supérieurs au titre de la pepsine mise en œuvre. Il faut attribuer ce fait à l'élimination par l'alcool d'une partie peu active de la pepsine qui passe en solution ; mais comme les poids obtenus sont faibles, aux pH très acides, les rendements en unités pepsiques (obtenus en multipliant le poids par le titre) sont relativement faibles en regard de celles obtenues dans les mêmes expériences avec l'acétone. (Voir pages 34 à 39).

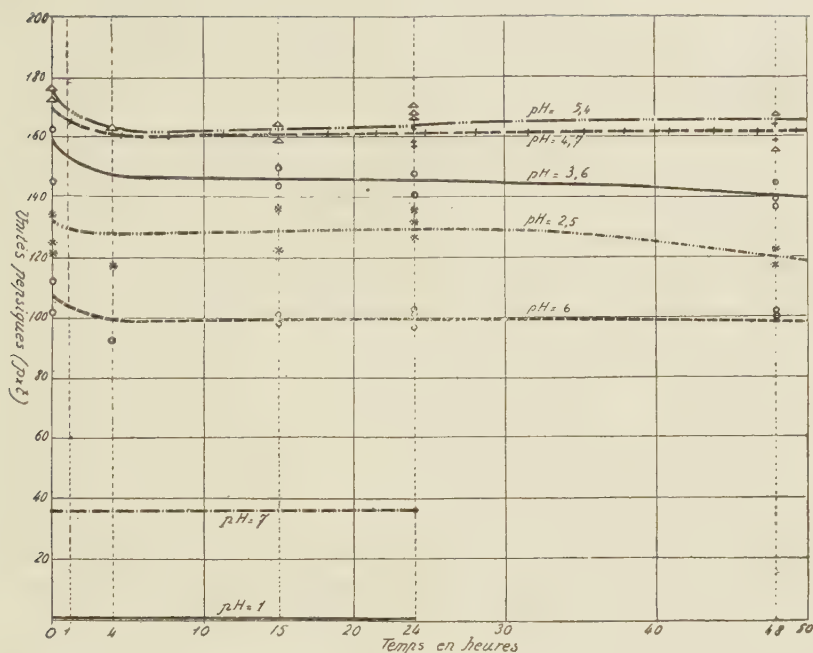


Fig. VI.

Activités des précipités pepsiques obtenus par précipitation alcoolique en fonction du temps et du pH.

Le temps de contact maximum expérimenté, de 48 heures, entre la pepsine et l'alcool en gros excès, et dans les conditions ci-dessus exposées, semble provoquer une très légère diminution dans l'activité protéolytique de la pepsine; mais cette perte minime ne paraît pas vouloir permettre d'énoncer des conclusions aussi pessimistes que celles émises par certains auteurs déjà cités.

Il n'y a pas d'incompatibilité absolue entre la pepsine et l'alcool, pourvu que l'on maintienne le pH du milieu suffisamment acide, d'opérer avec un gros excès d'alcool à la température de $+18^{\circ}$ et de terminer le contact après 48 heures.

Dans ces conditions, la pepsine souffre très peu d'avoir subi l'action floculante de l'alcool, puisque, après en être séparée par centrifugation et séchage, elle retrouve son activité.

B. - PEPSINE OBTENUE PAR PRÉCIPITATION AU MOYEN D'ALCOOL ABSOLU, A DIFFÉRENTS POURCENTAGES

Dans cette série d'expériences, nous avons repris les mêmes conditions que nous nous étions fixées dans nos études semblables faites avec l'acétone.

Nous avons donc fait une solution de pepsine T. 1000 à 10 p. 100 ajustée à un pH de 2,5.

Nous avons vu dans le précédent exposé de nos expériences, la précipitation alcoolique de la pepsine, que c'est précisément à ce pH de 2,5 que nous avons obtenu le plus petit poids de ferment précipité ainsi qu'un des meilleurs rendements en titre Codex.

C'est donc pour ces deux raisons : parallélisme possible avec nos expériences faites avec l'acétone, et conditions favorables de précipitations alcooliques, que nous avons fixé au pH 2,5 le pH de la solution pepsique ; nous avons également utilisé les mêmes volumes de cette solution et les mêmes volumes d'alcool pour avoir le même pourcentage de liquide flocculant.

Nous rappellerons brièvement la technique déjà suivie :

- Dans une série de tubes à centrifuger nous introduisons 5 cc. de solution de pepsine T. 1000 à 10 p. 100 ajustée au pH 2,5 avec Q.S. d'acide chlorhydrique normal, puis dans le :
- 1^{er} tube nous versons 5 cc. d'alcool absolu pour avoir un pourcentage alcoolique de 50.
 - 2^e tube nous versons 6 cc. 1 d'alcool absolu pour avoir un pourcentage alcoolique de 55.
 - 3^e tube nous versons 7 cc. 5 d'alcool absolu pour avoir un pourcentage alcoolique de 60.
 - 4^e tube nous versons 9 cc. 2 d'alcool absolu pour avoir un pourcentage alcoolique de 65.
 - 5^e tube nous versons 11 cc. 6 d'alcool absolu pour avoir un pourcentage alcoolique de 70.
 - 6^e tube nous versons 15 cc. d'alcool absolu pour avoir un pourcentage alcoolique de 80.
 - 7^e tube nous versons 20 cc. d'alcool absolu pour avoir un pourcentage alcoolique de 80.

8^e tube nous versons 28 cc. 2 d'alcool absolu pour avoir un pourcentage alcoolique de 85.

9^e tube nous versons 45 cc. d'alcool absolu pour avoir un pourcentage alcoolique de 90.

Nous procédons à cette addition d'alcool absolu au moyen d'une burette de MOHR, tandis que la température est maintenue constante à +18° ;

Nous effectuons les précipitations dans le moins de temps possible, centrifugeons les tubes, décantons le liquide surnageant, exposons les précipités au vide profond dans un exsiccateur à anhydride phosphorique.

Après avoir pesé les précipités, nous les dissolvons dans la solution chlorhydrique de pH 1,4 (solution 1), pour effectuer comme nous l'avons déjà expliqué le dosage de l'activité protéolytique du produit obtenu.

Comme pour l'acétone, mais avec beaucoup plus d'ampleur, nous avons retrouvé le même phénomène, c'est-à-dire la non dissolution, ou tout au moins la dissolution imparfaite des précipités obtenus, et cette fois-ci jusqu'aux pourcentages alcooliques de 85 ; les précipités formés par l'addition à la solution de pepsine de taux acétoniques plus élevés, donnant des solutions d'une limpidité très imparfaite.

Pour lever la difficulté, nous avons tenté de procéder aux précipitations alcooliques en les effectuant à très basse température, à —18°, ainsi que nous l'avons fait pour les fractionnements par l'acétone. Dans ces conditions, tous les précipités étaient parfaitement solubles.

1 ^o Résultats du rendement pondéral :					
Pourcentage alcoolique	50	55	60	65	70
à +18°	I 0.027	0.030	0.050	0.0905	0.151
	II 0.025	0.0315	0.051	0.099	0.1675
à —18°	I 0.024	0.0295	0.0485	0.089	0.140
	II 0.026	0.034	0.0505	0.097	0.142

1° - Résultats au rendement pondéral :				
Pourcentage alcoolique	75	80	85	90
à +18°	I 0.169	0.1985	0.200	0.245
	II 0.1675	0.190	0.212	0.242
à -18°	I 0.1725	0.193	0.2185	0.241
	II 0.168	0.1855	0.2195	0.240

Ces résultats permettent de tracer la courbe ci-après.



Fig. VII.

Poids des précipités de pepsine obtenus à pH 2,5 par addition d'alcool absolu à des pourcentages différents, à partir d'un poids initial de pepsine de 0 gr. 50.

2° Résultats du rendement protéolytique exprimé en titre Codex. — Pour les pourcentages alcooliques faibles et moyens, les précipités étaient très peu solubles lorsque la précipitation

était effectuée à $+18^{\circ}$, et les titres Codex mesurés étaient forcément très faibles : de l'ordre de grandeur de 500 à 800 au maximum.

A la température de -18° les précipités obtenus non seulement se dissolvaient bien, mais avaient une activité de ce fait, mesurable, et bien supérieure.

Ce phénomène de protection du ferment par la température très basse, se retrouve donc ici pour ces précipitations alcooliques, comme pour les précipitations acétoniques.

En plus des titres Codex mesurés nous avons calculé le rendement en unités pepsiques pour chaque série d'essais en effectuant le produit du titre Codex du précipité par son poids. Nous n'avons pas calculé le rendement des précipités obtenus à $+18^{\circ}$, puisque cette série d'expériences n'offre pas d'intérêt. Le rendement théorique initial était donc de :

$$0,50 \times 1000 = 500.$$

Pourcentage alcoolique	50	55	60	65	70
Titre Codex à $+18^{\circ}$	500	500	350	300	non déterminé
Titre Codex à -18°	I 700	700	900	1500	2200
	II 700	700	900	1300	2100
Rendement à -18° .	I 18	20	43	139	308
	II 16	24	45	128	298

Pourcentage alcoolique	75	80	85	90
Titre Codex à $+18^{\circ}$	800	1400	1400	1400
Titre Codex à -18°	I 1800	1600	1500	1400
	II 1900	1700	1500	1400
Rendement à -18°	I 310	308	327	337
	II 319	315	329	336

Ces résultats, obtenus à -18° , sont groupés dans les tableaux suivants et représentés par les courbes placées à la suite.

Pourcentage alcoolique	50 %			55 %		
	Poids	Titre Codex	Rendement	Poids	Titre Codex	Rendement
1 ^{er} essai	0.024	700	16	0.0295	700	20
2 ^e essai	0.025	700	18	0.034	700	24

Pourcentage alcoolique	60 %			65 %		
	Poids	Titre Codex	Rendement	Poids	Titre Codex	Rendement
1 ^{er} essai	0.0485	900	43	0.089	1500	133
2 ^e essai	0.0505	900	45	0.097	1300	126

Pourcentage alcoolique	70 %			75 %		
	Poids	Titre Codex	Rendement	Poids	Titre Codex	Rendement
1 ^{er} essai	0.140	2200	308	0.1725	1800	310
2 ^e essai	0.142	2100	298	0.168	1900	319

Pourcentage alcoolique	80 %			85 %		
	Poids	Titre Codex	Rendement	Poids	Titre Codex	Rendement
1 ^{er} essai	0.193	1600	308	0.2185	1500	327
2 ^e essai	0.1855	1700	315	0.2195	1500	329

Pourcentage alcoolique	90 %		
	Poids	Titre Codex	Rendement
1 ^{er} essai	0.241	1400	337
2 ^e essai	0.240	1400	336

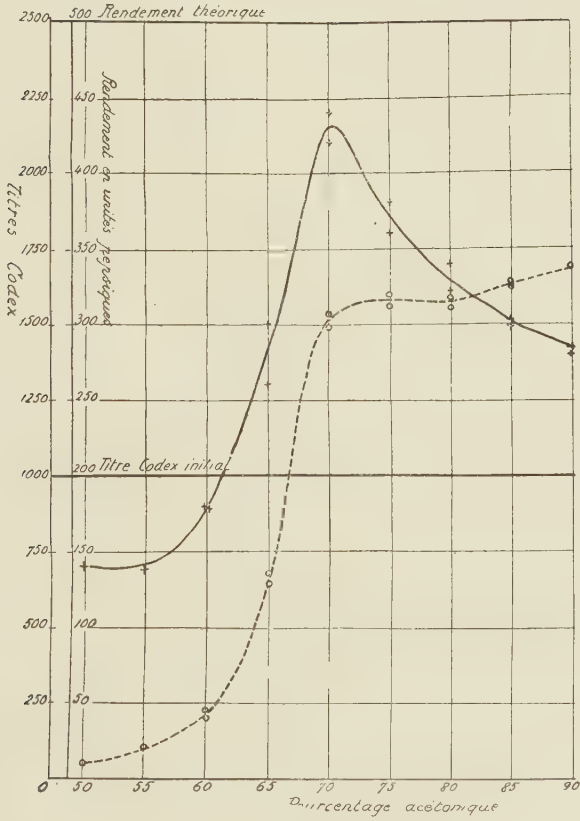


Fig. VIII.

La courbe en pointillé indique les titres Codex,
l'autre, en trait plein, indique les rendements.

Nous pouvons conclure :

1° Que les poids des précipités de pepsine obtenus par addition d'alcool absolu, à des pourcentages différents, sont beaucoup plus faibles que les précipités formés par addition d'acétone dans les mêmes conditions.

2° En opérant, comme pour nos essais à l'acétone, à la température de $+18^{\circ}$, les précipités sont presque tous insolubles et montrent, de ce fait, des activités protéolytiques, beaucoup plus faibles, que les précipités acétoniques.

3° Si la température est abaissée à -18° , les précipités alcooliques se dissolvent bien, et accusent alors une activité protéolytique qui dépasse 2.000.

4° Mais, même en se pliant à cette exigence de basse température, nous pensons pouvoir affirmer que l'alcool est un moins bon liquide flocculant que l'acétone, en vue de la purification de la pepsine. En effet les résultats obtenus sont tout à l'avantage de l'acétone, car, dans ce cas, les poids de précipités formés sont environ deux fois plus grands que dans le cas des précipitations alcooliques : les rendements sont alors bien plus forts, ainsi qu'il ressort de la comparaison des graphiques pages 47 et page 65.

5° De l'examen de ces graphiques, il est facile de conclure également que le précipité de pepsine obtenu à la température de $+18^{\circ}$, au pourcentage acétonique de 75 p. 100, montre un rendement en unités pepsiques qui approche de très près le rendement théorique. S'il n'en avait pas été ainsi nous aurions effectué une série semblable de précipitations acétoniques à la température de -18° ; mais comme la valeur de ces essais aurait été restreinte, nous avons jugé peu intéressant d'y procéder.

C. - PEPSINE OBTENUE PAR PRÉCIPITATION

ALCOOLIQUE FRACTIONNÉE

En examinant la courbe qui exprime la marche des essais de précipitation de la pepsine à des pourcentages alcooliques variables mais au pH 2,5, il est facile de voir que si on élimine la partie de la pepsine qui est précipitée à 60 p. 100 et que, si dans le liquide restant, on provoque un précipité nouveau par addition d'alcool, de manière à avoir un pourcentage alcoolique de 70 p. 100, ce nouveau précipité doit avoir une activité protéolytique très forte, puisque cette partie est purifiée par élimination préalable de produits précipitables, peu actifs.

C'est d'ailleurs ce que nous avons déjà prévu à propos des précipitations acétoniques et nous nous sommes proposé de reprendre par l'alcool ce que nous avons fait avec l'acétone en fractionnant la pepsine en solution.

Comme nous avons constaté les très mauvais résultats obtenus par précipitations alcooliques à pourcentages moyens et à $+18^{\circ}$, nous nous sommes tout de suite placé dans les conditions nécessaires à l'obtention de précipités solubles et actifs, c'est-à-dire en effectuant les précipitations à -18° .

Nous avons employé une solution à 10 p. 100 de pepsine T. 1000 ajustée au pH 2,5; cette solution étant préparée, nous avons mesuré dans un tube à centrifuger taré, 15 cc. d'alcool absolu et nous l'avons plongé avec son contenu dans un mélange réfrigérant de glace et de sel qui atteignait -18° ; après 5 minutes, l'alcool avait atteint cette température et nous y avons ajouté en agitant convenablement 10 cc. de la solution à 10 p. 100, soit un gramme de pepsine. Après avoir attendu à nouveau que la température soit redescendue à -18° , nous avons centrifugé très rapidement et après trois minutes nous avons recueilli le liquide surna-

geant et porté ce premier précipité sous vide profond dans un exsiccateur à anhydride phosphorique. Dans le liquide décanté, nous avons ajouté 8 cc. 2 d'alcool, pour obtenir un taux alcoolique de 70 p. 100 en prenant les mêmes précautions que précédemment, pour assurer au mélange une température à peu près constante de -18° . Après nouvelle centrifugation et décantation, nous avons ajouté à ce liquide 16 cc. 8 d'alcool pour obtenir un taux alcoolique de 80 p. 100 ; enfin le liquide obtenu par une dernière centrifugation était évaporé à siccité, et le résidu pesé.

Comme pour nos essais précédents, nous avons calculé le rendement en unités pepsiques de chacun des précipités, en multipliant leur poids par leur titre Codex.

Le rendement théorique initial était de : 1 gramme $\times 1000 = 1000$.

Voici les résultats obtenus :

Pourcentages alcooliques	Premier essai			Deuxième essai		
	Poids	Titre Codex	Rendement	Poids	Titre Codex	Rendement
60 %	0.171	750	49.7	0.1655	700	45.8
70 %	0.2195	2100	561.9	0.2245	2200	493.9
80 %	0.1745	450	78.5	0.1640	400	65.6
Extrait sec	0.5485			0.562		
Totaux.	1.0135		589	1.016		605

Il ressort de ce tableau, que les totaux des rendements ne dépassent guère 600 au lieu de 1000 que l'on devrait théoriquement retrouver. Pour les fractionnements à l'acétone, nous avons eu à peu près les mêmes pertes d'activité (de 54 p. 100), mais en opérant à $+18^{\circ}$. Ici nous opérons à -18° ,

température à laquelle la perte d'activité totale pour les fractionnements acétoniques n'était d'environ que de 10 p. 100. Mais comme ces expériences ont été conduites à pH 2,5 et que nous avons déjà vu qu'à ce pH 2,5 les poids obtenus de pepsine étaient les plus bas, ce très faible rendement pondéral peut expliquer que le total des rendements fermentaires soit peu élevé.

Avant de terminer nos études de l'action floculante de l'acétone et de l'alcool sur la pepsine il nous paraît intéressant, encore que nous n'ayons pas eu le temps de poursuivre cette étude, de faire remarquer que l'acétone paraît moins traumatisante que l'alcool.

D'une façon générale, il semble que l'action nocive de ces deux catégories de floculants, alcool d'un côté, acétone de l'autre, paraît d'autant moins grande que leur poids moléculaire est plus élevé.

Il eût été utile, en particulier, d'étudier les différences d'action de floculation et de destruction fermentaire, successivement par l'alcool méthylique, l'alcool éthylique, l'alcool propylique, les alcools butyliques, en sachant que si les deux premiers termes de cette série ont une action de floculation très nette vis-à-vis des protéines en particulier, cette action diminue lorsque l'on monte dans l'échelle des homologues supérieurs.

Mais cette étude, qui nous eût entraîné trop loin, n'a pas été entreprise.

CHAPITRE IV

Application de ces résultats à l'étude d'un élixir de pepsine

Etant donné le rôle protecteur joué par une acidité optima correspondant à un pH de 2,5 sur la pepsine, vis-à-vis de l'acétone et de l'alcool, il nous a semblé utile de clore nos essais actuels sur la pepsine par une étude de la conservation d'un élixir de pepsine.

Pour la confection d'un tel élixir, nous nous sommes inspiré de la formule du Codex dans laquelle nous avons remplacé 20 grammes de pepsine T. 100 par 2 grammes de la pepsine T. 1000 BYLA dont nous disposions, et nous avons remplacé le vin de LUNEL par une quantité d'alcool à 95° telle que le pourcentage alcoolique total fût de 15 p. 100. C'est à dessein que nous avons doublé le titre alcoolique de l'élixir de pepsine du Codex, afin de nous trouver dans les conditions d'un vin de pepsine analogue à celui du Codex 1884, pour lequel le titre alcoolique était de 15 p. 100 environ.

La formule exacte de notre élixir était :

Pepsine T. 1000.....	2 gr.
Eau distillée	640 cc.
Alcool à 95°	158 cc.
Glycérine	200 cc.

par simple solution.

Nous l'avons alors réparti en différents flacons ; nous avons constaté que le pH de l'élixir ainsi obtenu était de

5,2 nous avons ensuite porté les pH de notre élixir contenu dans des fioles différentes à 1, 2, 2,7, 6,2, et 7,5. Les fioles furent laissées à la température du laboratoire, tandis que des prélèvements étaient mis dans une étuve à 37°.

Voici quels ont été les résultats de la mesure de leur activité protéolytique, pratiquée selon notre méthode de FULD modifiée.

pH de l'éllixir	1° — A la température ordinaire de 18°-22° <i>Titre Codex correspondant à 50 cc d'éllixir, soit un gramme de pepsine T. 100</i>			
	Après un mois de contact	Après 2 mois de contact	Après 3 mois de contact.	
1	100	80	70	
2	100	80	80	
2.7	100	100	90	
5.2	100	80	70	
6.2	50	50	—	
7.5	30	10	—	
	2° — A la température constante de 37° <i>Titre correspondant à 50 cc d'éllixir</i>			
	Après 5 jours	Après 9 jours	Après 21 iours	Après 1 mois
1	50	30	0	0
2	90	80	60	40
2.7	100	100	90	70
5.2	80	20	0	0
6.2	20	0	0	0
7.5	0	0	0	0

A propos des élixirs du Codex, nous avons remarqué que la prise d'essai de l'élixir à 20 p. 100 de pepsine était de 10 cc., c'est-à-dire 0 gr. 20, soit deux fois plus que la prise d'essai assignée par le Codex, pour l'essai de la pepsine elle-même soit, 0 gr. 10.

Déjà CHASSAING (21) en 1887, faisait remarquer cette anomalie qui se trouvait aussi au Codex de 1884, et il écrivait : « De sorte que dans l'esprit des auteurs du Codex, par le fait même d'avoir incorporé de la pepsine dans ce vin ou dans cet élixir, elle aurait perdu la moitié de sa spécificité. Nous savons que cette tolérance a été une concession faite à l'opinion d'un physiologiste éminent qui, se basant sur ce que la pepsine est précipitée de sa solution par l'alcool concentré, et qu'un essai de digestion artificielle est impraticable en présence de ce véhicule, on avait conclu que les préparations alcooliques de pepsine étaient peu rationnelles. Il était cependant bien facile de se convaincre du contraire et il suffisait pour cela de quelques expériences des plus simples et des plus concluantes ».

Plus tard, THIBAUT (23), en 1902, écrivit par contre d'après des expériences faites sur des solutions qu'il appelait véhicule-élixir que « la dilution du milieu digestif — les conditions du temps de digestion restant les mêmes — n'apporterait pas la possibilité d'une peptonisation complète par 1 gramme de pepsine en milieu contenant 20 grammes d'élixir ou de vin, il y aurait simplement une légère amélioration allant jusqu'à la peptonisation complète lorsque la dose de ferment est 2 », et il ajoutait plus loin : « le ralentissement digestif est nul avec 5 et 10 grammes de véhicule élixir, très sensible avec 15 grammes, beaucoup plus accentué avec 20 grammes, la dose de pepsine restant 1 gramme, cette entrave apportée aux digestions artificielles par 20 grammes d'élixir véhicule est très importante et il est bon d'y insister dès maintenant, car elle deviendra capitale pour les essais d'élixir de pepsine suivant le Codex ».

C'est cette dernière opinion qui a prévalu jusqu'au Codex 1908 où nous retrouvons l'apparente anomalie du Codex 1884.

Quant à nous, nous ne nous sommes pas préoccupé de cette différence dans le poids de prise d'essai des élixirs, et le poids de prise d'essai de pepsine elle-même ; nous avons constaté que l'altération au pH 5,2, pH qui est celui de l'élixir lui-même sans addition d'acide ou d'alcali, pour être assez rapide n'est pourtant pas immédiate, et qu'elle demande au moins trois mois pour diminuer notablement. La tolérance du Codex semble donc exagérée, toutefois nous ferons remarquer que la pepsine de titre 1000, même employée à doses 10 fois moindre est peut-être un peu plus résistante que la pepsine T. 100 ; de plus, dans l'élixir du Codex, il y a du vin de LUNEL contenant par conséquent du tanin, substance empêchante de la pepsine, tandis que nous avons remplacé ce vin par de l'alcool ; c'est peut-être ce qui pourrait expliquer la meilleure résistance de notre élixir.

Il est surtout remarquable que la résistance de l'élixir soit très nette aux environs du pH 2,5 même lorsque cet élixir a été abandonné à l'étuve à 37°. Il y a là une indication qui dans la pratique pharmaceutique peut avoir son importance ; cependant comme l'altération se poursuit malgré tout, nous pouvons conclure comme THIBAUT le faisait il y a 25 ans : « Les préparations alcooliques de pepsine peuvent être considérées comme caduques et ne répondent pas à ce que l'on est en droit d'attendre des préparations efficaces et sûres. Si je n'écoutais que mon appréciation personnelle, je conseillerais d'écarter sans exception, toutes les préparations liquides alcooliques ou non, de pepsine ; la pepsine en poudre restant seule comme préparation officielle ».

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

De l'examen général de notre travail, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

1^o Nous avons été amené à modifier la technique de dosage de la pepsine selon FULD et LEVISON, pour mettre au point une *méthode de FULD modifiée*, aussi exacte que celle du Codex et environ 5 fois plus rapide. Au surplus, il n'est pas douteux, que par sa précision et sa rapidité elle puisse rendre aux biologistes quelque service.

2^o Au cours d'essais préliminaires, visant l'action de l'acétone sur la pepsine, nous avons déterminé le seuil de louchissement et de floculation de la pepsine en solution, en fonction du pH. D'après les courbes établies nous avons conclu qu'il y a un parallélisme étroit entre les courbes de louchissement et de floculation du colloïde pepsique, et que, c'est au voisinage des pH 2,2 à 2,8 que le volume d'acétone nécessaire pour faire apparaître l'un et l'autre phénomène est maximum.

3^o Nous avons mis en évidence le fait qu'à pH 2,5 et dans les conditions de l'expérience, l'action traumatisante

de ce flocculant était pratiquement nulle ; il n'en est plus de même si l'on s'éloigne de cette acidité optima, qui correspond au *point isoélectrique* de ce ferment.

4° Lorsque nous avons procédé à des précipitations de la pepsine, en solution à pH 2,5 avec des pourcentages acétoniques variant de 50 à 90 p. 100, nous avons constaté que les précipités formés aux pourcentages acétoniques faibles (surtout à 60 p. 100) étaient très imparfaitement solubles, et que les précipités pepsiques obtenus à 70 et 75 p. 100 d'*acétone* ont des *titres Codex* de 1.700 en moyenne, alors que la pepsine mise en œuvre avant purification, avait un titre Codex de 1000.

5° Les précipités pepsiques qui prennent naissance par l'action de l'acétone à faible pourcentage sont insolubles, quand cette précipitation s'effectue à $+18^{\circ}$; si celle-ci a lieu à basse température (à -18°) les produits obtenus sont au contraire très solubles. D'autre part, tandis qu'à $+18^{\circ}$, il y a une grosse perte dans le rendement en unités pepsiques des précipités formés par fractionnements, cette perte est moins élevée à -18° : une *basse température* semble donc jouer un rôle très important dans la protection de la pepsine vis-à-vis de l'acétone.

6° Les précipitations de la pepsine à l'aide de l'alcool absolu en gros excès, à des pH différents, dans les mêmes conditions qu'avec l'acétone, montrent que les poids de précipités obtenus sont variables et *fonction des pH* : à pH 2,5, point isoélectrique de la pepsine, les poids recueillis sont les plus faibles, ils augmentent jusqu'à pH 5,4, puis diminuent lorsque l'acidité du milieu tend vers la neutralité. Dans le cas des précipitations acétoniques, les précipités obtenus, étaient au contraire de poids sensiblement constants.

7° En revanche, d'une façon générale, les fractions de pepsine obtenues par l'alcool, présentent des titres fermentaires plus élevés que celles obtenues par l'acétone, mais, étant de poids moindre, les rendements en unités pepsiques obtenus sont en définitive, plus faibles avec le premier flocculant qu'avec le second.

7° L'expérience montre également que lors des précipitations alcooliques, la température joue un rôle encore plus important que dans le cas des précipitations acétoniques ; en effet, les précipités alcooliques formés à $+18^{\circ}$ accusent une activité protéolytique plus faible que celle des précipités acétoniques obtenus à cette même température de $+18^{\circ}$. Par contre si les expériences sont effectuées à basse température (à -18°), il est possible, par des précipitations alcooliques, d'obtenir des fractions de pepsine à titre fermentaire notablement plus élevés.

8° Comme conclusions générales à ce travail nous dirons que la concentration en ions ($H+$) du milieu, d'une part, et la *basse température*, d'autre part, sont des facteurs de protection de la pepsine, vis-à-vis de l'acétone et de l'alcool.

9° Et, comme conclusion pratique, nous pourrions donner, en nous inspirant de ce qui précède, le *procédé suivant de purification de la pepsine* :

Faire dissoudre 1 gramme de la pepsine déterminée, à 18° , dans 6 cc. d'eau distillée, additionnée de 1 cc.,20 d'acide chlorhydrique normal ; ajouter la quantité suffisante d'eau distillée pour avoir un volume total de 10 cc. ; le pH de cette solution est de 2,5. Ajouter 30 cc. d'acétone pur, anhydre, rectifié ; centrifuger le mélange, décantier le liquide surnageant et sécher sous vide la pepsine ainsi purifiée ; son titre sera augmenté au moins des $3/4$ de sa valeur initiale.

10° Enfin, le rôle protecteur du pH 2,5 se fait également sentir sur la pepsine en solution dans un élixir, dont la for-

mule se rapproche par son titre alcoolique de celle du vin de pepsine du Codex 1884 ; c'est-à-dire que notre élixir ayant un titre alcoolique de 15 p. 100, et étant ajusté au pH 2,5, se conserve mieux que d'autres échantillons du même élixir ajustés à des pH inférieurs ou supérieurs au pH 2,5. Mais, malgré cette précaution, une telle préparation ne garde pas indéfiniment toute son activité protéolytique.

Vu, bon à imprimer,
Le Président de la Thèse :
E. TASSILLY.

Vu,
le Doyen de la Faculté ;
M. RADAIS.

Vu et permis d'imprimer,
Le Recteur :
M. CHARLETY.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) S. ARRHENIUS. — Uber die dissociation der in Wasser gelosten stoffe. *Ztschr. für physik. Chem.*, 1887, **I**, 631.
- (2) S. L. SORENSEN. — Enzymstudier ; II Om Maalingen og Betydningen af Brintionkoncentration ved enzymatiske Processer Meddelesser fra Carlsberg Laboratoriet, 1909, **I**, 1 à 150.
- (3) R. DOURIS. — Une nouvelle notation de l'acidité pH. *Bull. Sc. Pharmacol.*, 1923, **30**, 8 et 9, 477.
- (4) CLARK. — *The determination of hydrogen ions*. 2^e édition 1925, 35. Baltimore, Williams et Wilkins Co.
- (5) BIGWOOD. — Méthodes de détermination du pH des liquides de l'organisme. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1928, **10**, 47.
- (6) L. MICHAELIS. — *Manuel de technique de physico-chimie et spécialement de chimie biologique*. Traduction de H. Chabanier et C. Lobo-Onell. 2^e tirage 1925, 46. Paris, Masson et Cie.
- (7) P. THOMAS. — *Cours de Chimie biologique*, 1926, 1 et 101, Paris, Les Presses Universitaires de France.
- (8) J. LOEB. — *Les Protéines*, traduction de H. Mouton, 1924, 71, Paris, Félix Alcan.
- (9) J. C. FORBES. — The purification of pepsin, its properties, and physical characters. *Journ. of biol. Chem.*, 1927, **71**, 559 à 584.
- (10) R. MARSTON. — The azin and azonium compounds of the proteolytic enzymes. *Biol. Journ.*, 1923, **17**, 851.
- (11) F. FENGER et R. H. ANDREW. — On the isoelectric precipitation of pepsin. *Journ. of Biol. Chem.*, 1927, **73**, 370 à 381.

- (12) RITTHAUSEN. — Kristallinische Eiweisskörper aus verschieden Oelsamen. *Journ. für prakt. Chem.*, 1881, **23**, 481.
 - (13) G. BERTRAND. — *Guide pour les manipulations de Chimie biologique*, 1919, 231. Paris, Dunod et Pinat.
 - (14) E. RENAUD. — *Etude Pharmacologique de la pepsine*. Th. Doct. Univ. (Pharm.), 52. Paris, 1922.
 - (15) R. FROSSARD. — *La papaïne et sa protéolyse*. Th. Doct. Univ. (Pharm.), 8, Paris, 1926.
 - (16) THOMAS, B. OSBORNE. — *The vegetables proteins*, 31, New impression, 1919, London-Longmans, Green and Co.
 - (17) R. DELAUNAY et O. BAILLY. — Sur une méthode d'essai rapide de la pepsine médicinale. *Bull. Sc. Pharmacol.*, 1915, **22**, 24.
 - (18) E. FULD et LEVISON. — Die Pepsinbestimmung mittels der Edestinprobe. *Bioch. Ztschr.*, 1907, **6**, 473.
 - (19) WAKSAM et DAVISON. — *Enzymes*, 1926, 47. London-Baillere, Tindall and Cox.
 - (20) VULPIAN. — *Rapport à l'Académie de Médecine*, 1873 ; d'après le *Dictionnaire de Thérapeutique* de Dujardin-Beaumetz, 1889, **4**, 169. Paris O. Doin.
 - (21) CHASSAING. — *Etude pratique de la pepsine*. Th. Doct. Univ. (Pharm.), 68, Paris 1887.
 - (22) BARDET. — De l'action de l'alcool sur la pepsine. *Bull. de la Soc. de Thérap.*, 1887, **14**, 98.
 - (23) THIBAUT. — *Etude sur les préparations officinales de la pepsine*. Th. Doct. Univ. (Pharm.), 22, 38 et 81. Paris 1902.
 - (24) JAVILLIER. — *Des ferments protéolytiques*. Th. Agrégation, 33, Paris, 1909.
-

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	1
Notions sur les pH.....	1
Notions sur les colloïdes	4
Définition du titre d'une pepsine.....	6
Procédé de Forbes de purification de la pepsine.....	7
Autre procédé du même auteur.....	8
Procédé de purification de la pepsine par Fenger et Andrew..	9
PLAN de la THÈSE.....	10
MESURE DE L'ACTIVITÉ PEPSIQUE	13
Méthode de dosage de la pepsine à l'aide de l'édestine.....	14
Modification de la Méthode de Fuld	21
Résumé de notre méthode de Fuld modifiée.....	26
ACTION DE L'ACÉTONE SUR LA PEPSINE.....	31
Etude du pourcentage acétonique nécessaire à la floculation d'une solution de pepsine	31
Etude de l'activité fermentaire de la pepsine en présence de l'acétone.....	34
Pepsine obtenue par précipitation au moyen d'acétone à divers pourcentages.....	40
Pepsine obtenue par précipitations fractionnées acétoniques	48
ACTION DE L'ALCOOL SUR LA PEPSINE	53
Etude de l'activité fermentaire de la pepsine en présence de l'alcool.....	53
Pepsine obtenue par précipitation au moyen de l'alcool à dif- férents pourcentages	60
Pepsine obtenue par précipitations alcooliques fractionnées..	67
APPLICATION DE CES RÉSULTATS A L'ÉTUDE D'UN ELIXIR DE PEPSINE	71
CONCLUSIONS GÉNÉRALES.....	75
BIBLIOGRAPHIE	79

